

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRCIO HAMAMURA

DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PARVOVÍRUS CANINO EM  
CÃES COM GASTROENTERITE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ



PALOTINA-PR

2017

MÁRCIO HAMAMURA

DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PARVOVÍRUS CANINO EM  
CÃES COM GASTROENTERITE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Takiuchi

PALOTINA-PR

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

H198 Hamamura, Márcio  
Diagnóstico e caracterização molecular do parvovírus canino  
em cães com gastroenterite da região Oeste do Paraná / Márcio  
Hamamura . – Palotina, 2017.  
69f.

Orientadora: Elisabete Takiuchi.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. Parvovírus canino . 2. Diagnóstico . 3. Caracterização  
molecular. 4. Análise filogenética . I. Takiuchi, Elisabete  
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 619



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor PALOTINA  
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

ATA Nº

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL**

No dia dez de Fevereiro de dois mil e dezessete às 08:30 horas, na sala 03, Bloco Lacom, foram instalados os trabalhos de arguição do mestrando **MÁRCIO HAMAMURA** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada **DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PARVOVÍRUS CANINO EM CÃES COM GASTROENTERITE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ELISABETE TAKIUCHI (UFPR), MARLISE POMPEO CLAUS (IFC), MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra ao discente, para que o mesmo expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. O aluno respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e o mestrando deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO do aluno. O mestrando foi convidado a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ELISABETE TAKIUCHI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Palotina, 10 de Fevereiro de 2017.

ELISABETE TAKIUCHI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARLISE POMPEO CLAUS

Avaliador Externo (IFC)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS

Avaliador Externo (UFPR)

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Márcio Hamamura, natural de São Paulo, 08 de abril de 1980. Médico Veterinário formado pela Universidade Estadual de Londrina em 2004. Coursou especialização *lato sensu* no Centro Universitário de São José do Rio Preto de 2005 a 2007 e especialização *lato sensu* pela Universidade Federal do Paraná de 2007 a 2009. Em 2014 ingressou no mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a oportunidade de participar do programa de pós-graduação da UFPR – Setor Palotina, onde fui muito bem recebido e apoiado pelos participantes do programa.

Agradeço a minha orientadora, Elisabete Takiuchi, que me recebeu, teve a paciência e o dom de ensinar os caminhos da biologia molecular. A convivência aumentou muito a minha admiração por uma profissional extremamente dedicada e que tem uma dádiva, um dom, um toque de Midas que faz com que o que ela faça, faça da melhor forma possível.

Agradeço a mãe dos meus filhos, minha companheira, minha maior inspiração, meu amor, Mônica Kanashiro Oyafuso que não só esteve ao meu lado como fez inúmeros sacrifícios para que eu pudesse concluir essa etapa.

Agradeço as minhas colegas de mestrado Andressa Kunz, Jessica Gallego, Priscila Pereira, Wellington e a residente Izabel Gogone pelo apoio, ajuda na realização do projeto e pela amizade.

Agradeço ao laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri e a doutoranda Flávia Possatti, onde uma parte fundamental do experimento foi realizada.

Agradeço ao pessoal do Hospital Veterinário da UFPR que me ajudou e apoiou na realização das disciplinas, requisito para o mestrado.

Aos meus amigos palotinenses que me ajudaram de forma direta ou indireta na realização desse mestrado torcendo, rezando e de alguma forma estiveram presente nesse período tão conturbado.

A minha família que teve paciência com minhas ausências e furos mesmo em datas importantes para que eu pudesse me dedicar algumas horas a mais na dissertação.

Foram muitos os que estiveram presentes ou distantes me apoiando e eu só posso ser grato a todos, espero fazer valer.

*“Ciência, meu garoto, consiste em cometer erros. Mas são erros que valem a pena serem cometidos, pois pouco a pouco eles nos levam a verdade. ”*

Jules Verne

## RESUMO

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é um dos principais enteropatógenos de cães, determinando alta morbidade e mortalidade em populações suscetíveis. Desde a sua emergência no final dos anos 70, o CPV-2 vem sofrendo mutações que conferiram vantagens adaptativas ao longo de sua evolução. Atualmente os três subtipos de CPV-2 circulantes são denominados CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. O presente estudo teve como objetivo diagnosticar e caracterizar os subtipos de CPV-2 em cães da região oeste do Paraná entre 2012 e 2016. Foram analisadas pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), 93 amostras fecais de cães com gastroenterite. Destas, 78,5% (73/93) resultaram positivas para amplificação parcial do gene VP2. O sequenciamento e caracterização molecular de 41 amostras revelou cinco subtipos CPV-2b e 36 subtipos CPV-2c. O CPV-2c foi o subtipo predominante até 2015, sendo substituído pelo CPV-2b em 2016. Entre as amostras caracterizadas como CPV-2c, 13 foram idênticas à amostra referência de CPV-2c originalmente isolada na Itália e de outros países da Europa, América do Norte e América do Sul, incluindo o Brasil. Uma amostra apresentou a mutação Thr440Ala localizado no principal sítio antigênico da VP2. Quatro amostras apresentaram a mutação silenciosa no resíduo 447 e 18 amostras a mutação silenciosa no resíduo 500. O monitoramento constante dos subtipos de CPV-2 circulantes na população canina é necessário para subsidiar estudos epidemiológicos, de patogenicidade e de evolução do CPV-2 no Brasil.

Palavras-chave: Parvovírus canino, diagnóstico, caracterização molecular, análise filogenética



## ABSTRACT

### *Canine parvovirus diagnosis and molecular characterization in dogs with gastroenteritis from Paraná west region*

Canine parvovirus type 2 (CPV-2) is one of the most important enteric pathogen in dogs with high morbidity and mortality on susceptible populations. Since its emergence in late 70s, CPV-2 has undergone mutations gaining adaptive advantages with its evolution. Three CPV-2 strains have been detected and were denominated CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c. This study objective was to diagnose and molecularly characterize CPV-2 strains circulating on Parana west region between 2012 and 2016. 93 fecal samples from dogs with gastroenteritis were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). 78,5% (73/93) were positive (with the VP2 protein partial gene amplification). Sequencing and molecular characterization were performed on 41 samples, five were CPV-2b and 36 CPV-2c. The latter were the predominant strain until 2015, being replaced in 2016 by the CPV-2b. 13 samples, characterized as CPV-2c, were identical to the reference CPV-2c strain originally isolated from Italy and other European, North American and South American countries, including Brazil. One sample showed a Thr440Ala mutation, which is the main antigenic site on VP2. Four samples had a silent mutation on residue 447 and 18 samples had a silent mutation on residue 500. Constant CPV-2 strains monitoring is necessary to subsidize epidemiologic, pathogenic and evolutionary studies of CPV-2 in Brazil.

Key words: Canine parvovirus, diagnostic, molecular characterization, phylogenetic analysis

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1 -</b>	Representação esquemática do genoma do CPV-2.....	17
<b>Figura 2 -</b>	Esquema de tradução das proteínas estruturais.....	18
<b>Figura 3 -</b>	Esquema da estrutura do CPV-2.....	19
<b>Figura 4 -</b>	Processos evolutivos do parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) com as mutações nos principais sítios da proteína VP2 do vírus da panleucopenia felina (FPV) e CPV-2. As posições aminoacídicas foram baseadas nas sequências de amostras de referência do CPV-2 e seus respectivos números de acesso no <i>Genbank</i> . M24004 (FPV), M2355 (CPV-2), M24000 (CPV-2a), M74849 (CPV-2b) e FJ005196 (CPV-2c) .....	22
<b>Figura 5 -</b>	Relação genética e hospedeiros do FPV, CPV e outros parvovírus relacionados.....	23
<b>Figura 6 -</b>	Fluxograma da patogenia do CPV-2.....	24

## CAPÍTULO 1

<b>Figura 1 -</b>	Mapa representativo da mesorregião oeste do Paraná com a sinalização dos municípios de domicílio dos cães avaliados entre 2012 e 2016.....	41
<b>Figura 2 -</b>	Visualização em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos de 583 pb correspondente à amplificação parcial do gene da proteína VP2 do CPV-2.....	44
<b>Figura 3 -</b>	Distribuição das amostras fecais analisadas por ano e resultados positivos para CPV-2 pela PCR, provenientes de cães com gastroenterite da região oeste do Paraná (2012 a 2016).....	45
<b>Figura 4 -</b>	Relação filogenética entre variantes genômicas de CPV-2 baseada em 427 nucleotídeos (nt 1270 a 1696) do gene da proteína VP2. As sequências obtidas neste estudo estão indicadas pelo símbolo ◆. As amostras de referência e as representativas de diversos países da América e Europa estão especificadas com o código de acesso do <i>GenBank</i> . A árvore filogenética foi inferida pelo programa MEGA7 utilizando o método de <i>Neighbor-Joining</i> , com as distâncias evolutivas calculadas pelo método Kimura 2 parâmetros. Valores de <i>bootstrap</i> são indicados próximos aos nós.....	49

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1 -</b>	Características dos cães diagnosticados positivos para CPV-2 com análise molecular do fragmento do gene VP2. Apenas os resíduos de nucleotídeos (nt 1270 a 1696) e/ou aminoácidos (aa 426 a 565) que exibiram diferenças foram especificados. As sequências nucleotídicas idênticas estão representadas com a mesma cor.....	47
-------------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
CID	Coagulação intravascular disseminada
CP	Cápside viral
CPV	<i>Canine parvovirus</i> (Parvovírus canino)
CPV-1	<i>Canine parvovirus type 1</i> (Parvovírus canino tipo 1)
CPV-2	<i>Canine parvovirus type 2</i> (Parvovírus canino tipo 2)
CPV-2a	<i>Canine parvovirus variant 2a</i> (Parvovírus canino subtipo 2a)
CPV-2b	<i>Canine parvovirus variant 2b</i> (Parvovírus canino subtipo 2b)
CPV-2c	<i>Canine parvovirus variant 2c</i> (Parvovírus canino subtipo 2c)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay” Ensaio de imunoabsorção enzimática
FPV	<i>Feline panleukopenia virus</i> (Vírus da panleucopenia felina)
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
G2	Fase de crescimento da mitose
HA	Hemaglutinação
HI	Inibição da hemaglutinação
Ile	Isoleucina
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Kilodaltons
kb	Kilobases
Leu	Leucina
Met	Metionina
MEV	Vírus entérico das martas
mL	Mililitros
mM	Milimoles
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
NS1	Proteína não estrutural tipo 1
NS2	Proteína não estrutural tipo 2
nt	Nucleotídeos
ORF	“Open reading frame” Fase de leitura aberta
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase - método quantitativo
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomoles
RaPV	<i>Raccoon parvovirus</i> (Parvovírus do guaxinim)
rpm	Rotações por minuto
S	Fase de síntese da mitose
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
Ser	Serina

SRD	Sem raça definida
TfR	Receptor transferrina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association
VP1	Proteína viral 1
VP2	Proteína viral 2
VP3	Proteína viral 3
μL	Microlitros
μM	Micromoles

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1. TAXONOMIA.....	16
2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PARVOVÍRUS CANINO.....	17
2.3. CICLO REPLICATIVO.....	19
2.4. EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.5. PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
2.5.1. Tecidos Linfoides e Medula Óssea.....	24
2.5.2. Epitélio Intestinal.....	25
2.5.3. Resposta Inflamatória Sistêmica.....	26
2.5.4. Miocardite.....	26
2.5.5. Outras apresentações clínicas.....	27
2.6. DIAGNÓSTICO.....	27
2.6.1. Hemaglutinação.....	28
2.6.2. Testes imunocromatográficos.....	28
2.6.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento.....	30
2.7. PROFILAXIA.....	30
2.8. FALHAS VACINAIS .....	32
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. OBJETIVO GERAL.....	38
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>5. CAPÍTULO 1 – DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PARVOVÍRUS CANINO EM CÃES COM GASTROENTERITE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....</b>	<b>39</b>
5.1. INTRODUÇÃO.....	40
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.2.1. Amostras clínicas.....	41
5.2.2. Extração de ácido nucleico.....	42

5.2.3. Reação em cadeia pela polimerase.....	42
5.2.4. Sequenciamento e caracterização molecular.....	43
5.2.5. Análise filogenética.....	43
5.3. RESULTADOS.....	44
5.3.1. Detecção do CPV-2 por PCR.....	44
5.3.2. Sequenciamento e identificação dos subtipos de CPV-2.....	46
5.4. DISCUSSÃO.....	50
5.5. CONCLUSÃO.....	54
5.6. REFERÊNCIAS.....	55
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>66</b>



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças gastroentéricas estão entre as causas mais frequentes de mortalidade e morbidade em cães jovens, sendo o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) um dos principais agentes etiológicos (DECARO et al, 2010).

O CPV-2 é um vírus DNA fita simples, não envelopado e extremamente resistente ao ambiente, o que o torna altamente contagioso na população suscetível (GREENE e DECARO, 2012). A taxa de substituição no DNA do CPV-2 é comparável a dos vírus com genoma RNA (HOELZER e PARRISH, 2010).

Desde sua emergência no final da década de 70, o CPV-2 original acumulou mutações com vantagens adaptativas que resultaram no surgimento de três variantes antigênicas (subtipos), denominadas CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c (MIRANDA e THOMPSON, 2016b). Embora o CPV-2 original não esteja mais circulante desde os anos 90, a maioria das vacinas atualmente disponíveis são produzidas com esta cepa ou com o CPV-2b. Não existe até o momento, nenhuma vacina no mundo produzida com o subtipo que emergiu mais recentemente, o CPV-2c (CASTRO et al., 2007; GODDARD e LEISEWITZ, 2010). Os estudos de patogenicidade envolvendo o CPV-2c são ainda conflitantes, porém, estudos recentes têm atribuído a este subtipo casos atípicos de parvovirose em animais adultos, vacinados e de maior gravidade clínica (GODDARD e LEISEWITZ, 2010). Estas constatações têm fomentado discussões sobre a eficácia das vacinas atuais na proteção contra subtipos heterólogos de CPV-2 (DECARO et al., 2008a; GODDARD e LEISEWITZ, 2010; WILSON et al., 2014).

Devido à semelhança dos sinais clínicos com outras enfermidades do trato gastrointestinal, o diagnóstico conclusivo da infecção por CPV-2 depende de apoio laboratorial (DESARIO et al., 2005).

Entre as técnicas disponíveis para a detecção do CPV-2 nas fezes de cães infectados estão o isolamento em cultivo celular, microscopia eletrônica, hemaglutinação viral, ensaio imunoenzimático (ELISA), testes rápidos imunocromatográficos, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e PCR em tempo real. Baixa sensibilidade, custo elevado e/ou laboriosidade metodológica constituem as principais desvantagens do cultivo celular, microscopia eletrônica

e ELISA para aplicação na rotina diagnóstica (BUONAVOGLIA et al., 2001; DESARIO et al., 2005). Já os testes imunocromatográficos de fase sólida são amplamente utilizados devido à facilidade de execução, interpretação e rapidez para obtenção dos resultados (KANTERE et al., 2015). Entretanto, é necessária uma grande quantidade de antígeno viral nas fezes para o sucesso do diagnóstico. Além disso, os métodos descritos somente indicam a presença do CPV-2 nas amostras, não sendo possível a caracterização dos subtipos de CPV-2. O conhecimento dos subtipos virais circulantes assume importância para elucidar aspectos epidemiológicos da infecção nas populações suscetíveis, bem como o impacto da vacinação, relações com cepas circulantes em diferentes regiões geográficas, aspectos de evolução e de patogenicidade viral (TOUIHRI et al., 2009).

A utilização de técnicas moleculares como a PCR, além de apresentar as vantagens de alta especificidade e sensibilidade, permite proceder a análise por sequenciamento genômico e caracterização molecular, mas a ocorrência de falsos negativos é possível devido a presença de inibidores fecais (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012).

O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência do CPV-2 pela PCR e proceder a análise molecular para caracterização dos subtipos de CPV-2 envolvidos em casos de gastroenterite em cães da região oeste do Paraná entre 2012 e 2016.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TAXONOMIA

A família *Parvoviridae* é composta pelas subfamílias *Densovirinae* e *Parvovirinae*, capaz de infectar hospedeiros artrópodes e vertebrados, respectivamente. Recentemente, foi proposta uma reclassificação da subfamília *Parvovirinae*, sendo incorporada a ela oito gêneros distintos. O gênero anteriormente conhecido como *Parvovirus*, foi renomeado para *Protoparvovirus* tendo o *Carnivore protoparvovirus 1* (protoparvovírus dos carnívoros 1) como espécie e quatro espécies-tipo: *Canine parvovirus* - CPV (parvovírus canino); *feline parvovirus* – FPV (parvovírus felino); *mink enteritis*

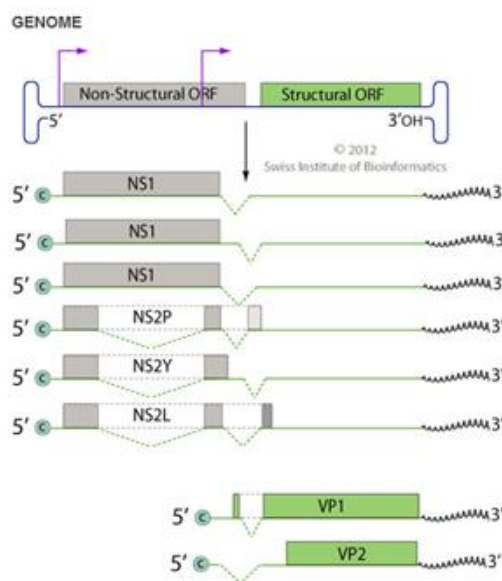
*virus* - MEV (vírus da enterite da marta) e *racoon parvovirus* – RaPV (parvovírus do guaxinim) (COTMORE et al., 2014; ICTV, 2015).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PARVOVÍRUS CANINO

Os parvovírus são vírus não envelopados, medindo cerca de 25 nm de diâmetro, sendo seu material genético composto de DNA de fita simples polaridade negativa com aproximadamente 5200 bases. O genoma contém duas fases de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORF), que codificam quatro proteínas, duas não estruturais (NS1 e NS2) e duas estruturais (VP1 e VP2/VP3) (Figura 1) (HOELZER e PARRISH, 2010; MORAIS e COSTA, 2007).

Na orientação convencional (5' → 3'), a ORF direita codifica as proteínas estruturais do capsídeo (VP1 e VP2), enquanto a ORF esquerda codifica as proteínas não estruturais (NS1 e NS2) (HOELZER e PARRISH, 2010). As proteínas não estruturais são codificadas através de *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA), devido aos genes sobrepostos, sendo a NS1 com funções de replicação do genoma viral e a NS2 associada a replicação do genoma, controle da expressão gênica e atua também na formação dos capsídeos (MORAIS e COSTA, 2007).

FIGURA 1 - Representação esquemática do genoma do CPV-2.

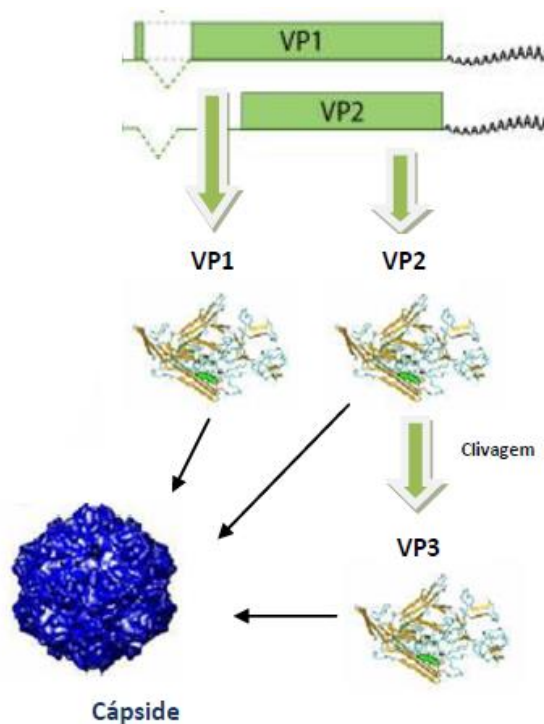


FONTE: Adaptado de Viral Zone, 2011.

O capsídeo viral, de simetria icosaédrica, é formado por 60 unidades proteicas de VP1 (5 a 6 cópias) e VP2 (54 a 55 cópias). A proteína VP2 pode ainda ser clivada na região amino terminal por proteases do hospedeiro e gerar uma proteína de 63 kDa, a VP3 (TSAO et al., 1991). As proteínas diferem na sua porção inicial (amino-terminal) ou modificações na estrutura após a tradução (PARKER e PARRISH, 1997).

A VP1, com 727 resíduos de aminoácidos (aa), é a maior dessas proteínas, com aproximadamente 83kDa, mas são encontradas em menor quantidade no capsídeo. A VP2, com 584 resíduos de aa, é formada pela clivagem do mRNA da VP1 e possui em torno de 64kDa. A VP3 é formada por clivagem de 18 a 20 aminoácidos da região amino-terminal de VP2 e se encontram nos vírions (TSAO et al., 1991).

FIGURA 2 - Esquema de tradução das proteínas estruturais.



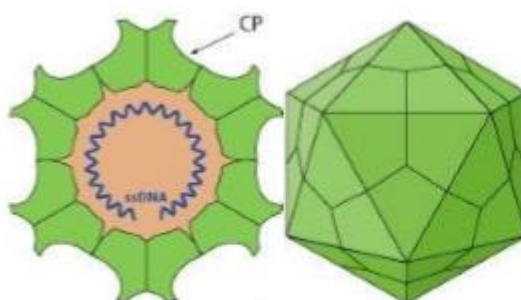
FONTE: Adaptado de Viral Zone, 2011.

A VP2 tem funções fundamentais na encapsidação e estabilidade vírica. Além disso é o sítio de ligação ao receptor do hospedeiro, tem papel de antígeno atuando como epítipo para a indução dos anticorpos neutralizantes e

confere ao vírus suas propriedades aglutinantes (CASTRO et al., 2007; GREENE e DECARO, 2012; PINTO et al., 2012).

A superfície do capsídeo é caracterizada pela presença de espículas (*spikes*), depressões (*dimple*) e estruturas cilíndricas circundadas por depressões (*canyons*) com funções de reconhecimento e ligação a receptores celulares e propriedades imunogênicas (Figura 1) (TSAO et al., 1991; MORAIS e COSTA, 2007).

FIGURA 3 - Esquema da estrutura do CPV-2. LEGENDA: CP – Capsídeo; SSDNA – Cadeia simples de DNA.



FONTE: Adaptado de Viral Zone, 2011.

No principal sítio antigênico da VP2 está localizado o resíduo 426, onde mutações específicas determina a diferenciação dos tipos de CPV-2 circulantes (BUONAVOGLIA et al., 2001). Por serem vírus não envelopados e de estrutura muito simples e compacta, eles possuem alta resistência frente a diversos agentes físicos e químicos no ambiente (MORAIS e COSTA, 2007; HOELZER e PARRISH, 2010, VIEIRA, 2011; GREENE e DECARO, 2012). O vírus pode resistir por meses a anos em ambiente propício (GREENE e DECARO, 2012); a partícula permanece estável na faixa de pH entre 3 a 9 e à temperatura de 56°C por até 60 minutos (MORAIS e COSTA, 2007).

### 2.3 CICLO REPLICATIVO

O CPV-2 inicia o ciclo de replicação ao se ligar aos receptores transferrina (TfR) das células caninas, a célula então faz endocitose e os vírions são transportados até a periferia do núcleo. O TfR é expresso de forma acentuada nas células em divisão ativa. O TfR parece ser um fator crítico ao

determinar a vulnerabilidade celular à infecção pelo vírus (HUEFFER e PARRISH, 2003). Após a adsorção no receptor celular, o complexo CPV-TfR penetra na célula via endocitose e é transportado até a periferia do núcleo com o auxílio dos microtúbulos. As alterações ocorridas dentro dos lisossomos alteram o capsídeo e propicia que ele seja capaz de entrar no núcleo e completar o processo (MORAIS e COSTA, 2007).

O genoma do CPV-2 é replicado no núcleo da célula por um mecanismo conhecido como “*Rolling hairpin*”. As sequências terminais do DNA viral, que são palindrômicas, dobram sobre si mesmas formando estruturas semelhantes a grampos de cabelo (*hairpin*) e atuam como iniciadores da replicação pela DNA polimerase celular. Ocorre a formação de intermediários de DNA de dupla fita, os quais são posteriormente clivados por enzimas em DNA fita simples (BERNS, 1990).

A replicação do CPV-2 ocorre predominantemente na fase S do ciclo de mitose celular e em menor proporção na fase G2; com isso as células com altas taxas de mitose são mais susceptíveis à infecção (MORAIS e COSTA, 2007), uma vez que o vírus não tem capacidade de induzir a mitose. Dessa forma, a infecção pode ser sistêmica em fetos ou recém-nascidos, enquanto em animais mais velhos fica restrito a tecidos com maior potencial mitótico como o tecido intestinal (HOELZER e PARRISH, 2010).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

O CPV-2 emergiu de forma pandêmica em 1978, associado com casos de enterite hemorrágica grave e acentuada leucopenia, com alta mortalidade na população canina suscetível. O CPV-2 foi assim denominado para diferenciar do parvovírus canino tipo 1 (CPV-1), também chamado vírus minuto canino, encontrado normalmente nas fezes de cães assintomáticos (GAGNON et al., 2016; GODDARD E LEISEWITZ, 2010; PARRISH et al., 1988). Estudos filogenéticos posteriores revelaram que o vírus surgiu em meados de 1970 e em 1978 ele já havia sido distribuído mundialmente, quando então foi detectado pela primeira vez (HOELZER e PARRISH, 2010; PARRISH et al., 1988).

A origem exata do vírus não está completamente esclarecida, porém a hipótese mais aceita é de que o vírus tenha se originado da mutação do vírus da panleucopenia felina (FPV) (HOELZER e PARRISH, 2010).

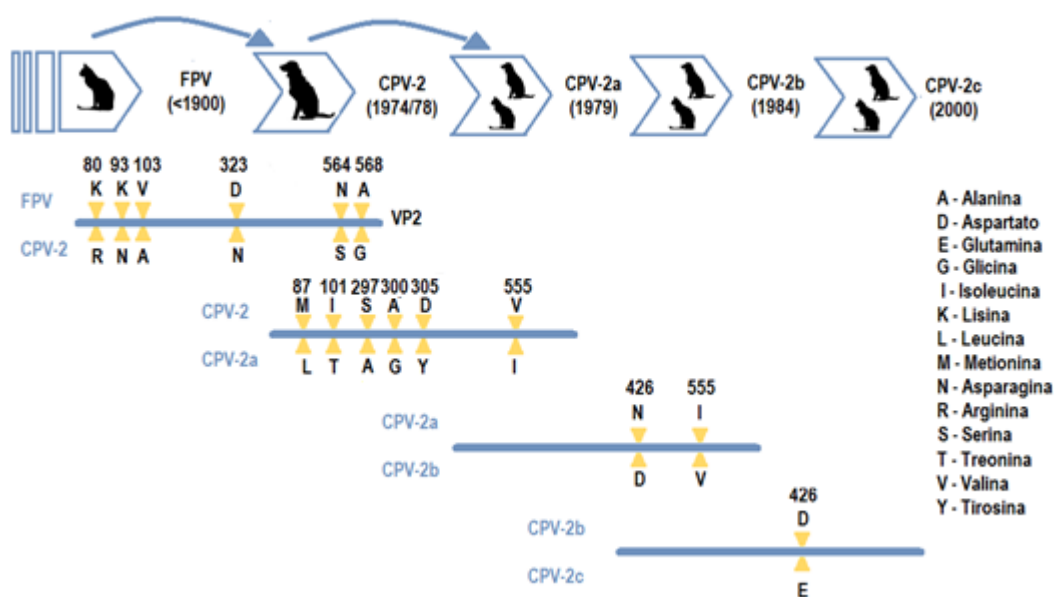
O CPV e o FPV têm acima de 98% da sequência de DNA idênticas, mas tem hospedeiros específicos, propriedades antigênicas e hemaglutinantes que são controladas pelo gene da proteína VP2 do capsídeo (TRUYEN et al. 1996; SHACKELTON et al., 2005). A bem-sucedida transferência e adaptação viral entre espécies a um novo hospedeiro canino envolveu mudanças de poucos aminoácidos na região das espículas. Essas seis mudanças genômicas foram suficientes para que o CPV-2 atingisse hospedeiros caninos, mas perdendo a habilidade de replicar em hospedeiros felinos (TRUYEN et al., 1996).

As características genéticas do CPV-2 como o DNA de fita simples e pequeno, faz com que sua taxa de mutações de suas proteínas seja muito alta, sendo próximas a de vírus RNA (HOELZER e PARRISH, 2010; PROKSCH et al., 2015). O vírus sofreu mutação rapidamente e em 1979 e meados de 1980, um novo tipo denominado CPV-2a emergiu. Essa nova variante 2a diferiu do CPV-2 original em apenas cinco a seis aminoácidos (PARRISH et al., 1988). Especificamente, as alterações nos resíduos 87 (Met para Leu), 300 (Ala para Gly) e 305 (Asp para Tyr) foram as que possibilitaram a readaptação do vírus na espécie felina. Além dessas alterações, também foram detectadas mutações nos resíduos 101 (Ile para Thr), 297 (Ser para Ala) e 555 (Val para Ile), conforme demonstrado na figura 4 (AGBANDJE et al., 1993; TRUYEN et al., 1996; TSAO et al., 1991).

Quatro anos após, em 1984, foi descrita uma mutação caracterizando o tipo CPV-2b (GODDARD e LEISEWITZ, 2010; PARRISH et al., 1988). Na análise de sequência do DNA, o tipo 2b difere em apenas dois aminoácidos na proteína VP2, resíduo 426 (Asn para Asp) e 555 (Ile para Val) (PARRISH et al., 1991). E finalmente, em 2000, a ocorrência do tipo CPV-2c foi primeiramente reportada na Itália (BUONAVOGLIA et al., 2001). A origem do tipo CPV-2c decorreu da mutação no resíduo 426 do CPV-2b (Asp para Glu). Entretanto, Decaro et al. (2007) relataram a detecção de CPV-2c em amostras coletadas em 1996, fornecendo evidências de que essa variante já circulava na Alemanha quatro anos antes da sua primeira detecção na Itália.

Portanto, a diferenciação dos três tipos de CPV pode ser efetuada pela análise aminoacídica no resíduo 426 da proteína VP2 (Asn no CPV-2a, Asp no CPV-2b e Glu no CPV-2c). A hipótese de origem e evolução do CPV-2 em cães está demonstrado na Figura 4, com indicação das principais mutações nos sítios antigênicos da VP2.

FIGURA 4 - Processos evolutivos do parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) com as mutações nos principais sítios da proteína VP2 do vírus da panleucopenia felina (FPV) e CPV-2. As posições aminoacídicas foram baseadas nas sequências de amostras de referência do CPV-2 e seus respectivos números de acesso no *GenBank*. M24004 (FPV), M2355 (CPV-2), M24000 (CPV-2A), M74849 (CPV-2B) e FJ005196 (CPV-2C).



FONTE: Adaptado de MIRANDA E THOMPSON 2016b.

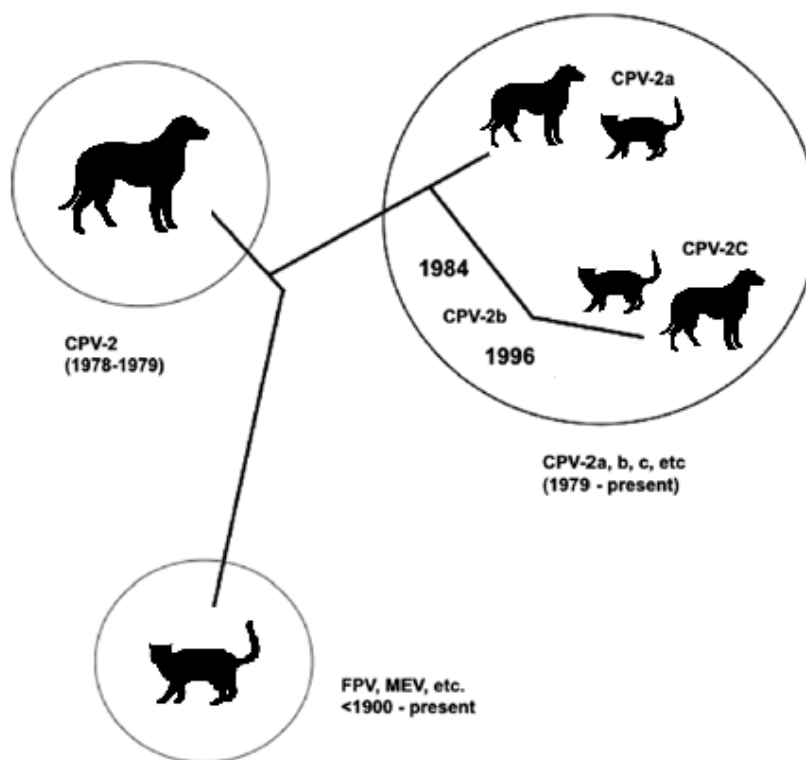
Os estudos epidemiológicos têm demonstrado que o CPV-2 original não se encontra mais em circulação, sendo substituído pelas variantes 2a, 2b e 2c com predominâncias variadas nos diferentes países (MIRANDA e THOMPSON, 2016b).

Houve rápida dispersão e substituição dos tipos CPV-2, CPV-2a e CPV-2b pelo CPV-2c, pois as variantes mostraram ser mais eficientes na ligação ao receptor que o CPV-2 original (HUEFFER e PARRISH, 2003) o que demonstra uma vantagem adaptativa e maior capacidade de causar a doença (Figura 5) (CASTRO et al., 2007). Estudos recentes têm reportado que desde 2011 o CPV-2c é o tipo predominante em várias regiões do mundo, incluindo países da



Europa, América do Norte e América do Sul (MIRANDA e THOMPSON, 2016b).

FIGURA 5 - Relação genética e hospedeiros dos vírus da panleucopenia felina (FPV) e parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) e suas variantes antigênicas. Os hospedeiros, subtipos e anos de emergência estão indicados.



FONTE: Adaptado de TRUYEN et al., 1996.

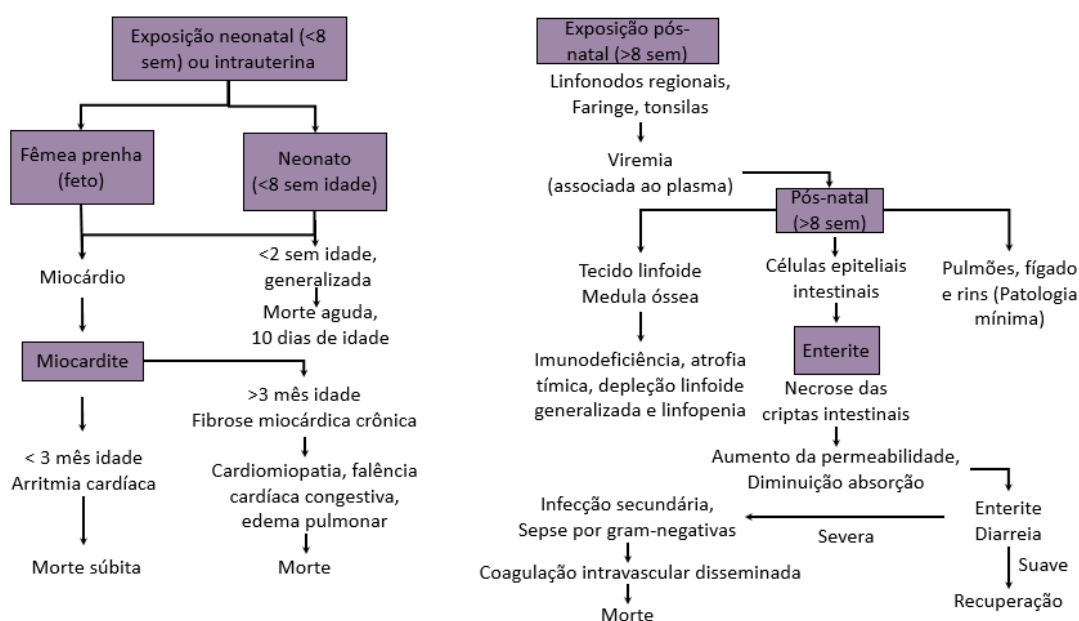
## 2.5 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os cães são infectados pela via de transmissão fecal-oral. Nos primeiros dois dias após a ingestão, a replicação viral ocorre na orofaringe e tecido linfóide local. A viremia então se estabelece e é mais evidente do terceiro ao quinto dia pós-infecção, sendo que o CPV-2 tem como tecidos alvo aqueles com intensa atividade mitótica. As células mais afetadas em filhotes são o tecido linfóide, epitélio intestinal (células da cripta), medula óssea e coração (Figura 6) (CARR-SMITH et al., 1997).

Algumas raças são consideradas mais susceptíveis à infecção pelo CPV-2, como Rottweilers, Dobermann Pinschers, Labradores, American Staffordshire Terriers, Pastores Alemães e Pitbulls (GREENE e DECARO,

2012; HALL e GERMAN, 2010; MCCAWE e HOSKINS, 2006). Embora as causas dessa susceptibilidade sejam desconhecidas, sugere-se que animais destas raças sejam geneticamente não responsivos ao CPV-2 (DAY et al., 2016).

FIGURA 6 - Fluxograma da patogenia do CPV-2.



FONTE: Adaptado de GREENE e DECARO, 2012.

### 2.5.1 Tecidos linfóides e medula óssea

A replicação viral com a destruição tecidual tem como alvo principal as áreas de células em rápida divisão, incluindo os centros germinativos de linfonodos e no córtex do timo (HUEFFER e PARRISH, 2003). No 3º dia pós infecção, a necrose linfóide é mais generalizada, sendo evidente a perda celular no timo dos cachorros (MCCAWE e HOSKINS, 2006). A infecção dos tecidos linfóides causa linfocitólise, depleção celular e posteriormente a regeneração nos animais sobreviventes.

O vírus dissemina-se a partir desses locais por via hematogena, provocando assim uma viremia primária (MCCAWE e HOSKINS, 2006). A viremia primária distribui os vírus para outros tecidos em rápida divisão, como a medula óssea, o tecido linfopoiético e o epitélio intestinal do jejuno e íleo. Na

medula óssea, a infecção provoca necrose tanto das linhas mielóides como eritróides (MCCAW e HOSKINS, 2006). Não são comuns alterações da contagem dos eritrócitos no sangue periférico devido à sua elevada meia-vida (PRITTIE, 2004).

As alterações na contagem de leucócitos começam entre o 3º e 5º dia pós infecção. A alteração mais precoce é a linfopenia, resultado da lise dos linfócitos logo no 1º ou 2º dia pós infecção. Em casos graves, aparece também uma neutropenia, com desvio a esquerda e neutrófilos tóxicos, aproximadamente aos seis dias pós infecção. Em animais convalescentes, é frequente a leucocitose e hiperplasia da medula óssea. A replicação e liberação do vírus nos tecidos infectados origina uma viremia secundária, com alta carga viral, durante o 3º e 4º dia pós infecção (MCCAW e HOSKINS, 2006).

#### 2.5.2 Epitélio intestinal

No intestino delgado, o vírus se replica nas células do epitélio germinativo das criptas do jejuno e íleo, região mitoticamente ativa das vilosidades intestinais. A consequente lise celular decorrente da replicação do CPV-2 nestas células é responsável pelo quadro clínico mais característico da parvovirose canina, a enterite hemorrágica (CARR-SMITH et al., 1997).

Com a lesão das criptas, as células diferenciadas da extremidade das vilosidades não são substituídas, o que acaba por provocar colapso da mucosa, com diminuição da sua capacidade de absorção e aumento da sua permeabilidade. As microvilosidades ficam primeiro revestidas por epitélio cuboide imaturo até que finalmente ocorre o desnudamento total da mucosa com exposição da lâmina própria, em casos graves. A diarreia hemorrágica se estabelece quatro a cinco dias após exposição oral (MCCAW e HOSKINS, 2006).

A parvovirose canina pode se apresentar mais severa em cães com uma barreira gastrointestinal previamente comprometida, associado a endoparasitismo ou infecção concomitante por coronavírus, por exemplo (CARR-SMITH et al., 1997; GODDARD e LEISEWITZ, 2010; POLLOCK e COYNE, 1993).

### 2.5.3 Resposta inflamatória sistêmica

A perda de células epiteliais secundária à infecção viral resulta no encurtamento das vilosidades intestinais levando a perda da regulação osmótica e diminuição na absorção, ocorrendo diarreia frequentemente com sangue e muco. A consequente absorção de endotoxinas causa um estado de pirexia e desidratação (HUEFFER e PARRISH, 2003).

Uma resposta inflamatória menos aparente e global ocorre em muitos filhotes acometidos pelo CPV-2. Infecções por *Escherichia coli* em pulmões ou fígado de muitos filhotes que foram a óbito por parvovirose e achados patológicos condizentes com síndrome de estresse respiratório agudo foram relatados (GREENE e DECARO, 2012). Esses achados sugerem que conforme a doença se agrava, ocorre translocação bacteriana e consequente sepse levando a resposta inflamatória sistêmica e morte (GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

Evidência de hipercoagulabilidade sem ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID) já foi documentada em pacientes com CPV-2 (PRITTIE, 2004). Endotoxinas e efeitos procoagulantes mediadas por citocinas nas células endoteliais, perda de anticoagulantes como a antitrombina pelo trato gastrointestinal junto com albumina, hiperfibrinogenemia e aumento no consumo dos mediadores de coagulação são outros mecanismos que podem desencadear esse estado de hipercoagulação (PRITTIE, 2004).

### 2.5.4 Miocardite

A idade do animal no período da infecção parece determinar se as células do miocárdio serão ou não afetadas. A intensa replicação dos miócitos inicia ainda dentro do útero e continua até a segunda semana de idade, condição necessária para suportar a replicação efetiva do CPV-2 (CARR-SMITH et al., 1997; POLLOCK e COYNE, 1993). O vírus também pode ser isolado de pulmões, baço, rins além do miocárdio, mas as lesões nesses outros órgãos são mínimas, não sendo clinicamente relevante (GREENE e DECARO, 2012).

Atualmente, a miocardite decorrente desta infecção é raramente observada, devido à imunidade da população canina que confere adequada proteção passiva aos neonatos (CARR-SMITH et al., 1997; POLLOCK e COYNE, 1993).

Cães infectados posteriormente a esta idade podem desenvolver enterite, mas não a miocardite (GREENE e DECARO, 2012).

#### 2.5.5 Outras apresentações clínicas

Uma apresentação neurológica da infecção pelo CPV-2 foi descrita com a ocorrência de leucoencefalomalácia difusa. A severa lesão em miocárdio com isquemia e hipóxia secundárias seriam os mecanismos implicados na ocorrência de necrose liquefativa da substância branca (PRITTIE, 2004).

### 2.6 DIAGNÓSTICO

A apresentação típica da doença com sinais clínicos como vômitos, diarreia, hematoquezia, letargia, desidratação, febre e leucopenia em filhotes não vacinados, não são específicos, mesmo sendo uma base forte para um diagnóstico presuntivo (GODDARD e LEISEWITZ, 2010). Diversos outros agentes podem causar os mesmos sinais clínicos como coronavírus, adenovírus, rotavírus, infecções bacterianas como salmonelose ou clostridiose e parasitas (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012). Portanto, a utilização de métodos laboratoriais específicos são de extrema importância para o diagnóstico definitivo. As técnicas disponíveis se baseiam principalmente na detecção direta do CPV-2 nas fezes dos cães no período agudo da infecção (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012).

O vírus pode ser detectado por microscopia eletrônica e isolamento viral em cultivo celular. Contudo, essas técnicas não são utilizadas na rotina diagnóstica, pois são laboriosas e onerosas, além de demandar pessoal qualificado para interpretação do resultado (POLLOCK e CARMICHAEL, 1983; DECARO e BUONAVOGLIA, 2012).

Técnicas de detecção viral como a hemaglutinação (HA), ELISA e PCR podem ser utilizadas para a detecção do CPV-2 em fezes e/ou tecidos de animais infectados (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012).

#### 2.6.1 Hemaglutinação (HA)

O CPV-2 possui a capacidade de aglutinar hemácias de várias espécies de animais em condições ideais como pH e temperatura (FENNER et al., 1993) e pode ser utilizado para a detecção do vírus em amostras de fezes recém coletadas (MCCAW e HOSKINS, 2006), sendo mais comum o uso de hemácias de macacos *rhesus* e de suínos (DESARIO et al., 2005; FENNER et al., 1993). As hemácias suínas apresentaram sensibilidade e especificidade superiores comparadas às hemácias de primatas não humanos (CASSEB et al., 2009). O teste utiliza uma placa de 96 poços, o que permite o processamento de várias amostras simultaneamente, os resultados sendo obtidos em aproximadamente quatro horas.

A técnica, porém, só pode ser feita em laboratórios especializados e requer condições específicas como a manutenção de suínos doadores, pois as hemácias devem ser frescas e livres de fatores que influenciem sua sedimentação como stress ou doenças (DESARIO et al., 2005).

A sensibilidade é considerada baixa, pois sofre interferência da presença de anticorpos neutralizantes no lúmen intestinal dos animais infectados, ocorrendo a adsorção nos vírions e inibindo a atividade hemaglutinante e a ligação em células do hospedeiro. Ainda existe a possibilidade de haver hemaglutinantes inespecíficos na amostra fecal, causando um falso positivo que deve ser confirmado com a inibição da hemaglutinação (HI) (DESARIO et al., 2005).

#### 2.6.2 Testes imunocromatográficos

Os testes imunocromatográficos comerciais para detecção de antígeno são amplamente utilizados em clínicas veterinárias devido a facilidade de execução e interpretação do resultado. O vírus é eliminado do 3º ao 12º dia pós-infecção e pode ser detectado por estes testes no pico de eliminação viral

(4 a 7 dias após a infecção) (POLLOCK e CARMICHAEL, 1983). Entretanto, é incapaz de distinguir os subtipos de CPV-2, sendo útil, portanto, na triagem inicial de animais suspeitos de infecção pelo vírus (PROKSCH et al., 2015).

Os testes de imunocromatografia são considerados menos sensíveis comparados a outros métodos laboratoriais, já que eles requerem uma significativa quantidade de antígenos para que haja a leitura positiva. Além disso, um certo grau de subjetividade na interpretação pode ocorrer de acordo com o operador, principalmente em amostras com baixa quantidade viral (DESARIO et al., 2005; KANTERE et al., 2015). Foi demonstrado que amostras contendo acima de  $10^9$  cópias de DNA viral/mg de fezes apresentam resultado positivo em testes imunocromatográficos (DECARO et al., 2010).

A ocorrência de anticorpos neutralizantes nas fezes foi cogitada como possibilidade para os resultados falso negativos na imunocromatografia (DESARIO et al., 2005). Um estudo aferiu a quantidade de anticorpos séricos e fecais por HI, demonstrando que os níveis de anticorpos foram detectados em poucos animais e não correlacionam bem com o resultado da imunocromatografia (PROKSCH et al., 2015). Outros fatores que podem contribuir para a baixa sensibilidade do teste são condições de armazenamento e o tempo para realizar o teste que deve ser feito o quanto antes, pois o atraso e armazenamento interferem na resposta ao teste (KANTERE et al., 2015), possivelmente devido a maior interação de agentes inibitórios como anticorpos neutralizantes ou menos provavelmente à degradação das partículas virais (DECARO et al., 2010).

Resultados falso positivos podem ocorrer em animais imunizados com vacinas vivas modificadas do terceiro ao décimo dia antes da realização do exame, o que pode resultar em eliminação do CPV-2 atenuado vacinal nas fezes (PRITTIE, 2004).

Recentemente foi sugerido que o tipo 2c esteja sendo subdiagnosticado, pois, a imunocromatografia considerada eficaz para os outros tipos de CPV-2 (2a e 2b), possa não ser tão sensível para esse subtipo (PROKSCH et al., 2015). No entanto, outro estudo demonstrou resultados de imunocromatografia com sensibilidade similar para os subtipos 2a/2b com o 2c (DECARO et al., 2010).

### 2.6.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento

A utilização da técnica de reação em cadeia pela Polimerase (PCR), permite o diagnóstico preciso (DECARO et al., 2005; DESARIO et al., 2005), mesmo com baixos títulos virais (KANTERE et al., 2015); possibilita o sequenciamento genético e determinação entre os subtipos desse vírus o que contribui para a caracterização dos subtipos de CPV-2 mais prevalentes em cada região (GREENE e DECARO, 2012). Além disso, possibilita a diferenciação de vírus selvagem do vírus vacinal (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012).

A técnica de *Real time* PCR ou PCR quantitativo (qPCR) permite a detecção e quantificação do ácido nucleico de CPV-2 em poucas horas. Além disso, tem menor risco de contaminação que o PCR convencional (DESARIO et al., 2005). A alta sensibilidade do qPCR permite que o CPV-2 seja detectado em baixos títulos e com isso permite que seja detectado em fases iniciais ou finais da doença (DECARO et al., 2005).

## 2.7 PROFILAXIA

A imunização ativa é a forma mais eficiente de conter o avanço da doença em uma população. Anticorpos neutralizantes se mostraram capazes de prevenir a infecção pelo CPV-2 e os anticorpos maternos protegem os filhotes da infecção e da doença (TRUYEN, 2006). Cães com altos títulos de anticorpos não desenvolvem infecção ativa e nem contribuem na disseminação da doença (PRITTIE, 2004).

No final dos anos 70 e início dos anos 80 a proteção de cães contra o CPV-2 era obtida pelo uso de vacinas contra o parvovírus felino, que conferia uma imunidade cruzada relativa. Entretanto, os níveis de proteção e duração do efeito protetor eram muito baixos. Essas vacinas foram então substituídas por vacinas com vírus vivo atenuado, que promoviam excelente proteção e maior duração da imunidade (SPIBEY et al., 2008). As vacinas atualmente disponíveis no mercado são constituídas por dois subtipos do CPV-2: o CPV-2 e o CPV-2b (DAVIS-WURZLER, 2014; DAY et al., 2016; PRATELLI et al., 2001).



Cães que se recuperaram de uma infecção ativa do CPV-2 tiveram títulos em HI variando de 1:640 a 1:2560 dois anos após a infecção, sugerindo que a imunidade adquirida após a infecção possa ser de longa duração ou até durar por toda a vida do animal (PRITTIE, 2004).

Estudos de imunização de vacinas com cepas de CPV-2b mostraram a conversão de altos títulos de anticorpos ao CPV-2 e ao vírus homólogo CPV-2b. Além disso, demonstraram maior eficácia para ultrapassar a barreira da imunidade materna quando comparadas às vacinas com cepas de CPV-2 (PRATELLI et al., 2001). Estudos realizados com pequeno número de animais demonstraram que vacinas contendo os subtipos CPV-2 e CPV-2b podem estimular a formação de títulos protetores contra o CPV-2c (SPIBEY et al., 2008; WILSON et al., 2014).

No entanto, há crescente controvérsia sobre a ocorrência de imunidade cruzada eficiente, pois diversos relatos de casos de gastroenterite hemorrágica causada pelo CPV-2c e estudos demonstrando a infecção de cães imunizados sugerem o contrário (DECARO et al., 2008a; GODDARD e LEISEWITZ, 2010; MIRANDA e THOMPSON, 2016a).

A detecção e caracterização dos tipos prevalentes na região se torna importante para que o diagnóstico precoce possa diminuir a mortalidade e morbidade dos pacientes com gastroenterite hemorrágica causada pelo parvovírus canino (DECARO et al., 2008a). Tem sido amplamente questionado que as vacinas deveriam incluir o tipo viral mais recente (CPV-2c) com o objetivo de conferir uma maior proteção na população canina suscetível (TRUYEN, 2006).

Uma população canina bem imunizada beneficia inclusive os animais não-responsivos por diminuir o risco à exposição e subsequente infecção pelo CPV-2 (DAVIS-WÜRZLER, 2014).

## 2.8 FALHAS VACINAIS

A interferência da imunidade materna é considerada uma das causas mais importantes da falha vacinal. No entanto a vacinação efetiva depende de outros fatores como o título materno e o tipo de vacina usada (PRITTIE, 2004).

A falha vacinal pode ocorrer por diversos fatores, sendo as mais relevantes: (1) a ação dos anticorpos maternos interferindo na ação da vacina. A recomendação para que as vacinas sejam feitas até depois das 14 semanas de idade ocorre por ser nessa idade em que 98% dos indivíduos não possuem mais níveis de anticorpos maternos que possam influenciar na resposta vacinal (DAY et al., 2007). Então, mesmo indivíduos que estão sendo submetidos a um protocolo vacinal ideal, passam por um período no qual eles tem títulos maternos insuficientes para evitar a infecção e ainda não desenvolveram a imunidade (GREENE e DECARO, 2012), esse período denominado janela de susceptibilidade. (2) A vacina pode não causar estímulo antigênico suficiente, isso podendo estar relacionado à produção da vacina com cepa viral inadequada, ou erro na atenuação do vírus, mal armazenamento (DAY et al., 2007), administração inadequada como aplicar em animais hipertérmicos ou pela via incorreta como por via intradérmica. (3) Há uma parcela da população canina que é geneticamente incapaz de responder à vacinação contra o CPV-2, independentemente do número de doses utilizadas (não-responsivos) (DAVIS-WÜRZLER, 2014).

Outros mecanismos podem levar a falha vacinal, e há indícios de que o tipo 2c possa infectar inclusive indivíduos vacinados (DECARO e BUNAVOGLIA, 2012) e felinos (MIRANDA et al., 2014). Estudos com antissoro contra os vários subtipos do CPV-2 foram realizados visando testar quantitativamente a ação neutralizante dos anticorpos, particularmente contra os tipos virais heterólogos. Esses estudos resultaram diferenças substanciais nos títulos neutralizantes. Então, mesmo que os títulos de anticorpos sejam suficientes para prevenir uma infecção a campo do subtipo homólogo de vírus, ele pode falhar contra um vírus de outro subtipo (PRATELLI et al., 2001).

As vacinas utilizadas atualmente contêm cepas atenuadas de altos títulos e baixa passagem de CPV tipo 2, e 2b, consideradas muito efetivas e promovem a proteção de cães contra a doença (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012;

WILSON et al, 2014). O termo alto título se refere a quantidade de partículas virais na dose vacinal, enquanto a baixa passagem se refere às inoculações em culturas de células para diminuir a virulência dos vírus. Vacinas com altos títulos e baixa passagem são as mais eficientes em conferir imunidade por reduzir a janela de susceptibilidade em filhotes com títulos de anticorpos passivos (PRITTIE, 2004).

### 3. REFERÊNCIAS

- AGBANDJE, M.; MCKENNA, R.; ROSSMAN, M.G.; STRASSHEIM, M.L.; PARRISH, C.R. Structure determination of feline panleukopenia vírus empty particles. **Proteins**, v.16, p.155-171, 1993.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of Canine Parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v.82, p.3021 – 3025, 2001.
- BERNS, K.I. Parvovirus replication. **Microbiological Reviews**, p. 316-329, 1990.
- CARR-SMITH, S.; MACINTIRE, D.K.; SWANGO, I.J. Canine Parvovirus: Part 1. **Pathogenesis and Vaccination Compendium of Continuous Education on Practice Veterinary**, v.19, p.125-133, 1997.
- CASSEB, A.; CASSEB, L.; VIEIRA, C.; CAMARGO, D.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, L.E. Diagnóstico da Parvovirose Canina pela Técnica de Hemaglutinação. **Revista de Ciências Agrárias**, v.51, p.83-98, 2009.
- CASTRO, T. X.; MIRANDA, S.C.; LABARTHE, N.V.; SILVA, L.E.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.333-339, 2007.
- CAVALLI, A.; BOZZO, G.; DECARO, N.; TINELLI, A.; ALIBERTI, A.; BUONAVOGLIA, C. Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. **New Microbiologica**. v.24, p.239-242, 2001.
- CLEGG, S.R.; COYNE, K.P.; DAWSON, S.; SPIBEY, N.; GASKELL, R.M.; RADFORD, A.D. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. **Veterinary Microbiology**, v.157, p. 78-85, 2012.
- COTMORE, S.F.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; CHIORINI, J.A.; MUKHA, D.V.; PINTEL, D.J.; QIU, J.; SODERLUND-VENERMO, M.; TATTERSTALL, P.; TIJSEN, P. The Family Parvoviridae. **Archive of Virology**, v.159, p.1239-1247, 2014.
- DAVIS-WÜRZLER, G.M. 2013 Update on Current Vaccination Strategies in Puppies and Kittens. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.44, p.253-263, 2014.
- DAY, M.; HORZINECK, M.; SCHULTZ, D. Guidelines for vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). **Journal of Small Animal Practice**, v.48, p.528-541, 2007.

DAY, M.; HORZINECK, M.; SCHULTZ, D.; SQUIRES, R.A. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, p. E1-E45, 2016.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; DESARIO, C.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M.L.; PARISI, A.; TERIO, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Characterization of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. **Research in Veterinary Medicine**, v.89, p.275-278, 2010.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus – A review of epidemiologic and diagnostic aspects with emphasis on type 2c. **Veterinary Microbiology**, v.155, p.1-12, 2012.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D.D.; MARTELLA, V.; VIEIRA, M.J.; ELIA, G.; ZICOLA, A.; DAVIS, C.; THOMPSON, G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; BUONAVOGLIA, C. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1222-1224, 2007.

DECARO, N.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; RICCI, D.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.133-138, 2005.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; MARI, V.; LAVAZZA, A.; NARDI, M.; BUONAVOGLIA, C. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiologica**, v.31 p.125-130, 2008.

DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**, v.126, p.179-185, 2005.

FENNER, F.; GIBBS, P.J.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. Classification and nomenclature of viruses in **Fenner's Veterinary Virology 2<sup>nd</sup> ed**, p.22 1993.

GAGNON, C.A.; ALLARD, V.; CLOUTIER, G. Canine parvovirus type 2b is the most prevalent genomic variant strain found in parvovirus antigen positive diarrheic dog feces samples across Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v.57, p.29-31, 2016.

GREENE, C. E.; DECARO, N. Canine Viral Enteritis in **Infectious Diseases of the Dog and Cat 3<sup>rd</sup> ed**, Elsevier, St Louis, Missouri, p.67-74, 2012.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A.L. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.40, p.1041-1053, 2010.

HALL, E.J.; GERMAN, A.J. Diseases of the Small Intestines in **Ettinger&Feldman - Textbook of Veterinary Medicine 9<sup>th</sup> ed**, Elsevier, St Louis, Missouri, p.1526-1572, 2010.

HOELZER, K.; PARRISH, C.R. The emergence of parvovirus of carnivores. **Veterinary Research**, v.41, p.39-42, 2010.

HUEFFER K, PARRISH R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.392-398, 2003.

KANTERE, M. C.; ATHANASIOU, L. V.; SPYROU, V.; KYRIAKIS, C. S.; KONTOS, V.; CHATZOPOULOS, D. C.; TSOKANA, C. N.; BILLINIS, C. Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of Canine Parvovirus under different storage conditions and vaccination status. **Journal of Virological Methods**, v.215-216, p.52-55, 2015.

MCCAW, D.; HOSKINS J. Canine Viral Enteritis in: **Greene, C. Infectious Diseases of the Dog and Cat 2nd ed.**, WB Saunders, Philadelphia, USA. Cap 8, p.63-71, 2006.

MIRANDA, C.; PARRISH, C.R.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26, p.462-464, 2014.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus in vaccinated dogs: a field study. **Veterinary Record**, v.178, p.397-402, 2016a.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v.97, p.2043-2057, 2016b.

MORAIS, M.P.; COSTA, P. R. Parvoviridae in **Virologia Veterinária**. UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, p.375-396, 2007.

PARKER, J.S.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. **Journal of Virology**. v.71, p.9214–9222, 1997.

PARRISH, C.R.; AQUADRO, C.F.; STRASSHEIM, M.L.; EVERMANN, J.F.; SGRO, J.; MOHAMMED, H.O. Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus. **Journal of Virology**, v.65, p.6544-6552, 1991.

PARRISH, C.R.; HAVE, P.; FOREYT, W.J. EVERMANN, J.F.; SENDA, M.; CARMICHAEL, L.E. The Global Spread and Replacement of Canine Parvovirus Strains. **Journal of General Virology**, V.69, p.1111-1116, 1988.

PINTO, L. D.; STRECK, A. F.; GONÇALVES, K. R.; SOUZA, C. K.; COBERLLINI, A. O.; COBERLLINI, L. G.; CANAL, C. W. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, v.165, p.29-33, 2012.

POLLOCK, R.H.; CARMICHAEL, L.E. Canine Viral Enteritis. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.13, p.551-566, 1983.

POLLOCK, R.H.; COYNE, M.J. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.23, p.555-568, 1993.

PRATELLI, C.R.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Canine Parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p. 612-615, 2001.

PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.14, p.167-176, 2004.

PROKSCH, A.L.; UNTERER, S.; SPECK, S.; TRUYEN, U.; HARTMANN, K. Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. **The Veterinary Journal**, v.204, p.304-308, 2015.

SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.102, p. 379-384, 2005.

SPIBEY, N.; GREENWOOD, N.M.; SUTTON, D.; CHALMERS, W.S.K.; TARPEY, L. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology**. v.128, p.48-55, 2008.

TOUIHRI, L.; BOUZID, I.; DAOUD, R.; DESARIO, C.; GOULLI, A.F.; DECARO, ABDERRAZAK, G., BUONAVOGLIA, C.; BAHLOUL, C. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. **Virus Genes**. V.38, p.249-258, 2009.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, v.117, p.9-13, 2006.

TRUYEN, U.; EVERMANN, J.F.; VIELER, E.; PARRISH, C.R. Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range. **Virology**, v. 215, p. 186-189, 1996.

TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LUO, M.; SMITH, T.J.; ROSSMAN M.G.; COMPANS, R.W.; et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, v. 251, p. 1456-1464, 1991.

WILSON, S.; ILLAMBAS, J.; SIEDEK, E.; STIRLING, C.; THOMAS, A.; PLEVOVÁ, E.; STURE, G.; SALT, J. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. **Vaccine**, v.32, p.5420-5424, 2014.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar e determinar o subtipo de parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) em cães com gastroenterite da região oeste do Paraná entre 2012 e 2016.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o CPV-2 em fezes de cães com gastroenterite pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação parcial do gene VP2 do CPV-2;
- Caracterizar molecularmente o subtipo de CPV-2 em uma amostragem representativa dos cães infectados;
- Avaliar a distribuição dos subtipos de CPV-2 detectados entre os anos de 2012 a 2016.



## **5 CAPÍTULO 1 - DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PARVOVÍRUS CANINO EM CÃES COM GASTROENTERITE DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

### **Resumo**

O parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) é um dos principais enteropatógenos de cães, determinando alta morbidade e mortalidade em populações suscetíveis. Desde a sua emergência no final dos anos 70, o CPV-2 vem sofrendo mutações que conferiram vantagens adaptativas ao longo de sua evolução. Atualmente os três subtipos de CPV-2 circulantes são denominados CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. O presente estudo teve como objetivo diagnosticar e caracterizar os subtipos de CPV-2 em cães da região oeste do Paraná entre 2012 e 2016. Foram analisadas pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), 93 amostras fecais de cães com gastroenterite. Destas, 78,5% (73/93) resultaram positivas para amplificação parcial do gene VP2. O sequenciamento e caracterização molecular de 41 amostras revelou cinco amostras pertencentes ao subtipo CPV-2b e 36 ao subtipo CPV-2c. O CPV-2c foi o subtipo predominante até 2015, sendo substituído pelo CPV-2b em 2016. Entre as amostras caracterizadas como CPV-2c, 13 foram idênticas à amostra referência de CPV-2c originalmente isolada na Itália e de outros países da Europa, América do Norte e América do Sul, incluindo o Brasil. Uma amostra apresentou a mutação Thr440Ala localizado no principal sítio antigênico da VP2. Quatro amostras apresentaram a mutação silenciosa no resíduo 447 e 18 amostras a mutação silenciosa no resíduo 500. O monitoramento constante dos subtipos de CPV-2 circulantes na população canina é necessário para subsidiar estudos epidemiológicos, de patogenicidade e de evolução do CPV-2 no Brasil.

Palavras-chave: Parvovirus canino, diagnóstico, caracterização molecular, análise filogenética

## 5.1 INTRODUÇÃO

Desde a sua emergência em 1978, o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2) se mantém como uma importante causa de doença gastroentérica de cães, acometendo de forma severa, principalmente os animais jovens e não imunes (CARR-SMITH et al., 1997; POLLOCK e CARMICHAEL, 1983).

O CPV-2 é um vírus pequeno, não envelopado, cujo genoma é constituído por uma fita simples de DNA com aproximadamente 5200 bases.

Embora seja um vírus DNA, a taxa de mutação nucleotídica do CPV-2 é semelhante à encontrada nos vírus RNA (SHACKELTON et al., 2005). A elevada taxa de mutação intrínseca e a pressão de seleção positiva do gene VP2, possibilitou o surgimento de variantes antigênicas (subtipos) do CPV-2 ao longo do tempo (HOELZER e PARRISH, 2010). Atualmente, o CPV-2 original não é mais detectado na população canina suscetível; sendo gradativamente substituído pelos subtipos CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. O surgimento do subtipo CPV-2a, em 1979, diferiu do CPV-2 original em cinco resíduos de aminoácidos (códon 87, 101, 300, 305 e 555) na proteína do capsídeo VP2. Em 1984, o CPV-2b surgiu apresentando mutações nos resíduos 426 e 555, em comparação à variante 2a, e no ano 2000, emergiu na Itália, o subtipo CPV-2c com alteração apenas no resíduo 426 (BUONAVOGLIA et al., 2001; HOELZER e PARRISH, 2010).

Diferente do CPV-2 original, a ocorrência dos subtipos 2a, 2b e 2c têm apresentado uma distribuição localizada e com prevalências variadas de acordo com o período do estudo (CALDERÓN et al., 2011; MIRANDA e THOMPSON, 2016b; PINTO et al., 2012).

No Brasil, o CPV-2c foi o subtipo predominante em estudos recentes abrangendo as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (CASTRO et al., 2010; 2011; FONTANA et al., 2013; PEREIRA et al., 2000; PINTO et al., 2012). Entretanto, no estado do Paraná, são ainda incipientes investigações epidemiológicas abrangentes e de caracterização molecular do CPV-2.

A utilização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) como método diagnóstico, além da alta sensibilidade e especificidade, possibilita o sequenciamento genotípico dos isolados de CPV-2 na população canina



As informações relacionadas à idade, sexo, raça, histórico vacinal e desfecho clínico foram obtidas dos prontuários de atendimento ou da ficha de encaminhamento de amostra preenchida pelos estabelecimentos veterinários. Os cães avaliados neste estudo eram de ambos os sexos, raças diversas e possuíam idades entre 30 dias a 14 anos e diferentes históricos de vacinação classificados de acordo com as diretrizes da Associação Veterinária Mundial de Pequenos Animais - WSAVA (não vacinados, vacinação incompleta, vacinação completa ou histórico desconhecido) (DAY et al., 2016).

### 5.2.2 Extração de ácido nucleico

Alíquotas de 450 µL das suspensões fecais foram tratadas com sódio dodecil sulfato (SDS) com concentração final de 1% (vol/vol), homogeneizadas e mantidas em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Após, as amostras foram submetidas a uma combinação das técnicas fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/ tiocianato de guanidina com pequenas modificações (ALFIERI et al., 2006). Para a validação dos procedimentos de extração, foram incluídas alíquotas de água DPEC e de uma vacina comercial multivalente contendo o CPV-2 como controle negativo e positivo, respectivamente.

### 5.2.3 Reação em cadeia pela polimerase

As amostras extraídas foram submetidas à PCR com a utilização dos *primers* 555for: 5'CAGGAAGATATCCAGAAGGA 3' e 555rev: 5'GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA 3' (BUONAVOGLIA et al., 2001) que amplificam um fragmento de 583 pb do gene da proteína do capsídeo VP2 (nt 4003 a 4585). A reação foi realizada em uma solução contendo 5 µL de DNA e 45 µL de PCR-MIX constituído por 20 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,6 µM de dNTP, 2,5 unidades de *Taq* Platinum DNA polimerase, 1 x PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl) e água DPEC com volume final de 50 µL. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: I) etapa inicial de desnaturação 10min/94°C; II) 40 ciclos de 1 min/94°C (desnaturação), 1 min/54°C

(anelamento) e 1 min/72°C (extensão); III) uma etapa de extensão final de 7 min/72°C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) durante aproximadamente 30 minutos. O gel foi posteriormente corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL para visualização dos amplicons em transiluminador UV e fotodocumentação digital.

#### 5.2.4 Sequenciamento e caracterização molecular

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen, USA), e a quantificação do DNA foi feita com fluorômetro Qubit™ (Invitrogen Life Technologies). A reação de sequenciamento de DNA foi realizada com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®), em ambas as direções, no analisador genético automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems®).

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e a identidade dos produtos foi comparada com sequências depositadas em bases públicas de dados (*GenBank*) e utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 5.2.5 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas neste estudo foram alinhadas no programa ClustalW. Os alinhamentos foram editados e corrigidos manualmente no programa Bioedit versão 7.1.3.0. A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR et al., 2016) utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura 2 parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi avaliada através do método de *bootstrapping* (com base em 1000 réplicas). Foram incluídas na análise filogenética as sequências de amostras referência do CPV-2 (M38245.1), CPV-2a (M24000.1), CPV-2b (M74849.1) e CPV-2c (FJ222821.1), assim como amostras representativas da Argentina, Alemanha, Espanha,

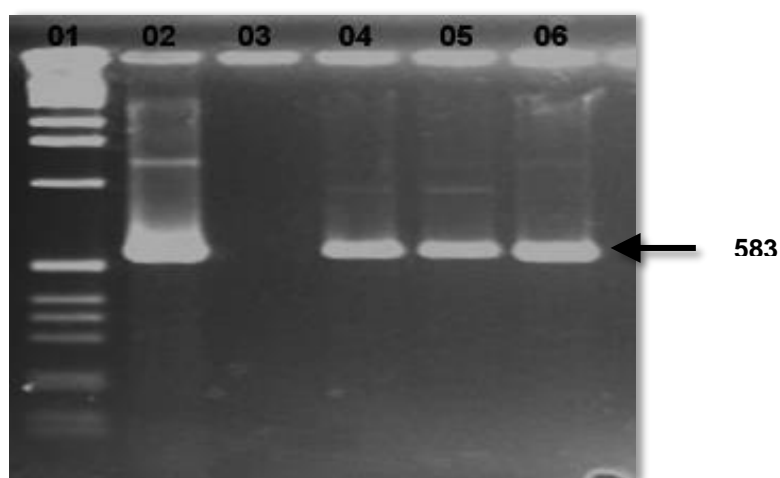
Estados Unidos, Itália, Paraguai, Portugal, Uruguai e de diferentes regiões do Brasil. A identificação das mutações aminoácidas e nucleotídicas foram comparadas com as respectivas sequências da amostra referência de CPV-2 original (M38245.1). Uma amostra do vírus da panleucopenia felina (KC473946.1) foi utilizada como *outgroup* na análise filogenética.

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Detecção do CPV-2 por PCR

Das 93 amostras fecais analisadas, o CPV-2 foi detectado em 73 (78,5%), resultando na amplificação parcial do gene da proteína VP2 de 583 pb (Figura 2).

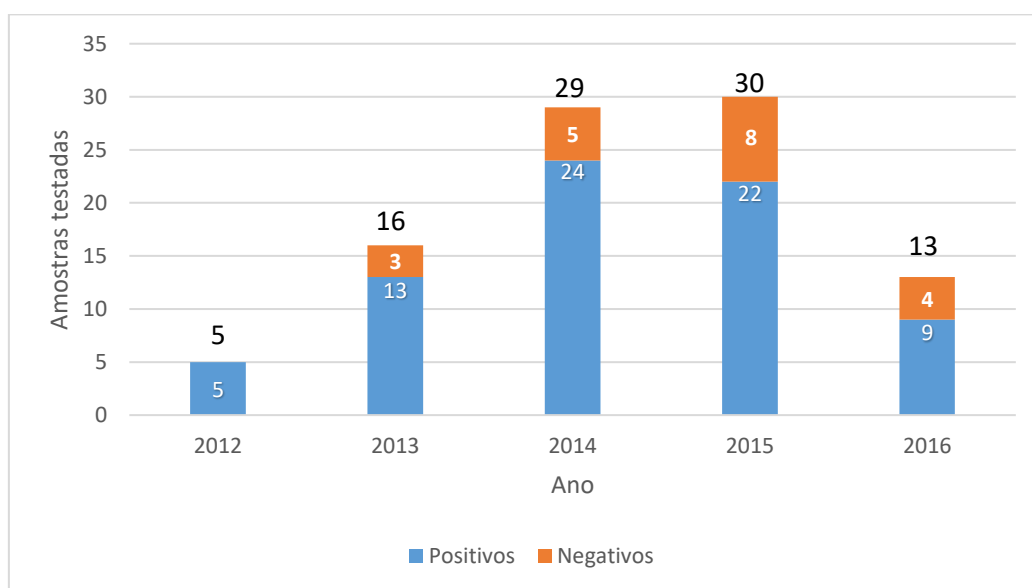
FIGURA 2 - Visualização em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos de 583 pb correspondente à amplificação parcial do gene da proteína VP2 do CPV-2, canaleta 1: padrão de tamanho molecular 1kb; canaleta 2: controle positivo, canaleta 3: controle negativo; canaletas 4 a 6: amostras positivas.



FONTE: O autor (2017).

A distribuição dos resultados positivos de CPV-2 pela PCR, por ano, está demonstrada na Figura 3.

FIGURA 3 – Distribuição das amostras fecais analisadas por ano e resultados positivos para CPV-2 pela PCR, provenientes de cães com gastroenterite da região oeste do Paraná (2012 A 2016).



Fonte: o autor (2017).

Dos 73 animais que resultaram positivos para CPV-2, 60,3% (44/73) sobreviveram à enfermidade, enquanto 37% (27/73) foram a óbito decorrentes de complicações clínicas da infecção. Não foi possível obter o desfecho clínico de apenas dois animais que resultaram positivos na PCR.

Quanto ao histórico vacinal, 9,6% (7/73) possuíam esquema de vacinação completo recomendado de acordo com a idade e 17,8% (13/73) vacinação incompleta. A maior frequência de ocorrência foi observada em animais não vacinados, totalizando 43,8% (32/73) dos animais positivos. Os 28,8% (21/73) restantes não possuíam registro sobre o histórico vacinal.

Considerando as raças mais suscetíveis à parvovirose canina (Rottweiler, Pastor Alemão, Labrador, Pinscher), estas totalizaram 16,4% (12/73) dos cães avaliados e 56,2% (41/73) eram animais sem raça definida (SRD). A faixa etária de 2 a 6 meses de idade foi a mais acometida, com 63% (46/73) dos casos. Quatro cães diagnosticados positivos possuíam idade acima de 6 anos, incluindo um animal com 14 anos de idade.

### 5.3.2 Sequenciamento e identificação dos subtipos de CPV-2

Das 73 amostras positivas, obteve-se o sequenciamento genômico de 41 amostras. A detecção de mutações em resíduos específicos da proteína VP2, em comparação à amostra referência de CPV-2 original (M38245.1), possibilitou a caracterização dos subtipos de CPV-2 associados aos casos de gastroenterite em cães da região oeste do Paraná. Das 41 amostras sequenciadas, 36 (88%) apresentaram a mutação Asn426Glu e 5 (12%) a mutação Asn426Asp, características do subtipo CPV-2c e CPV-2b, respectivamente. Não foi detectado o subtipo CPV-2a nas amostras avaliadas (Tabela 1).

Dentre as amostras caracterizadas como CPV-2c, 13 apresentaram-se idênticas à amostra referência de CPV-2c originalmente isolada na Itália (FJ222821.1). Apenas uma amostra (BR94/PR) apresentou a mutação Thr440Ala. Além disso, foram detectadas mutações pontuais silenciosas na terceira posição dos resíduos 447 (ATA para ATT) e 500 (GTA para GTG), em quatro e 18 amostras, respectivamente (Tabela 1). No resíduo 555, todas as amostras deste estudo codificaram o aminoácido isoleucina (Ile).

Esses resultados foram sustentados na árvore filogenética com a formação de três grandes clados. As amostras CPV-2b e CPV-2c segregaram em clados distintos juntamente com as respectivas amostras de referência para cada subtipo. Ainda, as amostras de CPV-2c agruparam-se em diferentes subclados em concordância com as mutações identificadas e especificadas na Tabela 1. Todas as 36 amostras CPV-2c circulantes, apresentaram alguma relação filogenética com isolados da Europa (Alemanha, Portugal e Itália), América do Norte (Estados Unidos) e América do Sul (Paraguai, Argentina, Uruguai) e de diversas regiões do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso). As sequências de CPV-2b identificadas foram idênticas aos isolados do Rio de Janeiro, Santa Catarina e Argentina, agrupando-se no mesmo clado (Figura 4).



TABELA 1: Características dos cães diagnosticados positivos para CPV-2 com análise molecular do fragmento do gene VP2. Apenas os resíduos de nucleotídeos (nt 1270 a 1696) e/ou aminoácidos (aa 426 a 565) que exibiram diferenças foram especificados. As sequências nucleotídicas idênticas estão representadas com a mesma cor.

Identificação da amostra	Ano	Idade (meses)	Sexo	Raça	Histórico vacinal	CPV-2 (subtipo)	Desfecho clínico	aa 426			aa 440			aa 447			aa 500			aa 555		
								nt 1276	nt 1277	nt 1278	nt 1318	nt 1319	nt 1320	nt 1339	nt 1340	nt 1341	nt 1498	nt 1499	nt 1500	nt 1663	nt 1664	nt 1665
M38245.1*						2		A	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	G	T	A
M24000.1*						2a		A	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
M74849.1*						2b		G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
FJ222821.1*						2c		G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR43/PR	2012	5	F	Labrador	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR44/PR	2012	2	F	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR45/PR	2012	2	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR46/PR	2012	2	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR93/PR	2013	24	F	SRV	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR94/PR	2013	2	M	SRD	VC	2c	Vivo	G	A	A	G	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR95/PR	2013	8	F	Fila	VI	2c	NI	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR99/PR	2013	4	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR100/PR	2013	1,5	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR101/PR	2013	3	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR102/PR	2013	3	M	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR103/PR	2013	5	F	Boxer	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR104/PR	2013	12	M	Schnauzer	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR105/PR	2013	5	M	Husky	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR106/PR	2013	7	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR109/PR	2013	4	M	Pinscher	VI	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR110/PR	2013	3	F	Pug	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR111/PR	2014	3	F	Labrador	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR112/PR	2014	1	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR113/PR	2014	108	F	SRD	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	T	G	T	A	A	T	A

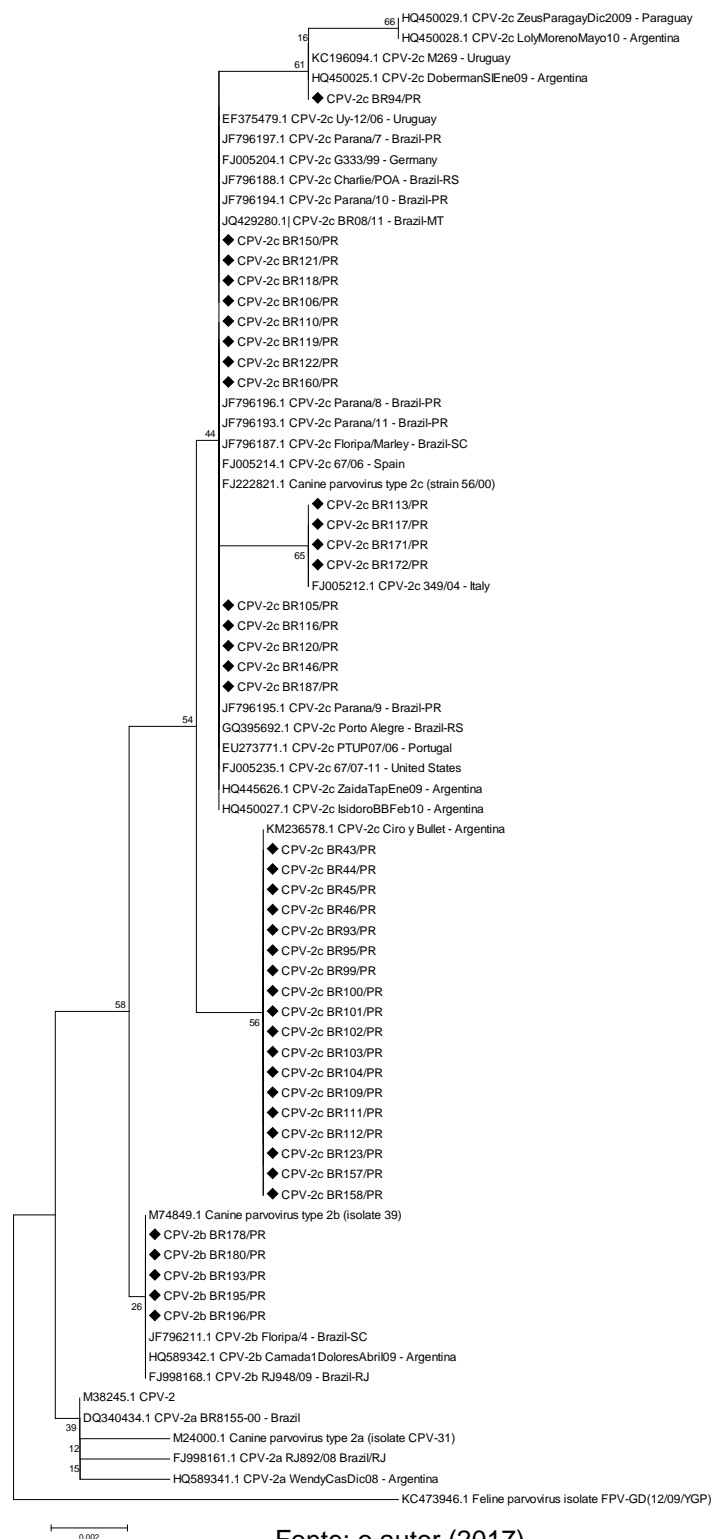
Identificação da amostra	Ano	Idade (meses)	Sexo	Raça	Histórico vacinal	CPV-2 (subtipo)	Desfecho clínico	aa 426			aa 440			aa 447			aa 500			aa 555		
								nt 1276	nt 1277	nt 1278	nt 1318	nt 1319	nt 1320	nt 1339	nt 1340	nt 1341	nt 1498	nt 1499	nt 1500	nt 1663	nt 1664	nt 1665
BR116/PR	2014	6	M	Pitbull	VI	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR117/PR	2014	5	F	Pinscher	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	T	G	T	A	A	T	A
BR118/PR	2014	NA	M	Pinscher	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR119/PR	2014	4	F	SRD	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR120/PR	2014	168	M	SRD	VI	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR121/PR	2014	2	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR122/PR	2014	12	M	Pequinês	VI	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR123/PR	2014	5	M	Pastor Al	VI	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR146/PR	2015	2	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR150/PR	2015	2	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR157/PR	2015	24	F	Fila	VI	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR158/PR	2015	36	F	SRD	VI	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G	A	T	A
BR160/PR	2015	7	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR171/PR	2015	9	F	Lhasa	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	T	G	T	A	A	T	A
BR172/PR	2015	5	F	Pitbull	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	T	G	T	A	A	T	A
BR178/PR	2015	7	M	SRD	NA	2b	NA	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR180/PR	2016	2	F	Labrador	NV	2b	Óbito	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR187/PR	2016	NA	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR193/PR	2016	4	F	Boxer	VI	2b	Vivo	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR195/PR	2016	5	F	SRD	NA	2b	Vivo	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A
BR196/PR	2016	6	M	SRD	NA	2b	Óbito	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A	A	T	A

\*: Códigos de acesso no *Genbank* de amostras de referência de CPV-2.

F: fêmea; M: macho; NA: não avaliado; NV: não vacinado; VI: vacinação incompleta; VC: vacinação completa de acordo com a idade; SRD: sem raça definida; NA: não disponível.

Resíduo aa 426: AAT-Asn; GAT-Asp; GAA-Glu. Resíduo aa 440: ACA-Thr; GCA-Ala. Resíduo aa 447: ATA-Ile; ATT-Ile. Resíduo aa 500: GTA-Val; GTG-Val. Resíduo aa 555: GTA-Val; ATA-Ile.

FIGURA 4 - Relação filogenética entre variantes genômicas de CPV-2 baseada em 427 nucleotídeos (nt 1270 a 1696) do gene da proteína VP2. As sequências obtidas neste estudo estão indicadas pelo símbolo ◆. As amostras de referência e as representativas de diversos países da América e Europa estão especificadas com o código de acesso do *Genbank*. A árvore filogenética foi inferida pelo programa MEGA7 utilizando o método de *Neighbor-joining*, com as distâncias evolutivas calculadas pelo método Kimura 2 parâmetros. Valores de *bootstrap* são indicados próximos aos nós.



Fonte: o autor (2017).

## 5.4 DISCUSSÃO

A frequência de ocorrência da parvovirose canina foi de 78,5% (73/93) nos cães com gastroenterite avaliados entre os anos de 2012 e 2016. Dos animais diagnosticados como positivos, 36,9% (27/73) foram a óbito, evidenciando que a infecção pelo CPV-2 ainda é uma importante causa de doença gastroentérica em cães, com alta morbidade e mortalidade (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012; MIRANDA e THOMPSON, 2016a). Embora a maioria dos cães positivos (41/73) não possuíam raça definida (SRD), 12 eram das raças Rottweiler, Pastor Alemão, Labrador ou Pinscher, que são consideradas as mais suscetíveis à infecção pelo CPV-2 (CARR-SMITH et al., 1997; HOUSTON et al., 1996).

A mortalidade pode variar de 90% para animais não tratados a 45,9% para animais em tratamento (GODDARD e LEISEWITZ, 2010), a alta mortalidade (37,5%) observada nos animais incluídos neste estudo ocorreu mesmo sob tratamento e pode ser atribuída à falta de imunidade, visto que 43,8% (32/73) não eram vacinados e 17,8% (13/73) possuíam protocolo de vacinação incompleto. Adicionalmente, a faixa etária mais acometida foi de 2 a 6 meses (63%). Nesta fase, muitos animais ainda não completaram o esquema de vacinação recomendado (três a quatro doses com intervalo de 21 a 30 dias a partir dos 45 a 60 dias de idade) e além disso, podem estar no período de janela imunológica, aumentando a susceptibilidade à infecção. A janela imunológica compreende o período em que os níveis de anticorpos maternos já são insuficientes para proteger os filhotes da infecção, porém são capazes de bloquear e inibir a resposta ativa do hospedeiro frente à estimulação antigênica (DECARO et al, 2005; GREENE e DECARO, 2012; GODDARD e LEISEWITZ, 2010).

Além do diagnóstico da parvovirose canina, este estudo objetivou a caracterização antigênica de CPV-2 associados aos casos de gastroenterite. O sequenciamento genômico e posterior análise de 41 amostras positivas na PCR, caracterizou 5 delas como CPV-2b e 36 como CPV-2c. O CPV-2c foi detectado em todos os anos, sendo o único subtipo entre os anos 2012 e 2014 e o predominante em 2015. Entretanto, neste estudo, foi observada a co-circulação dos subtipos 2c e

2b em 2015, este último tornando-se a variante predominante nos casos avaliados em 2016. (Tabela 1).

Este é o primeiro estudo abrangente de caracterização de subtipos circulantes de CPV-2 ao longo dos anos no estado do Paraná. Até o momento, eram disponíveis apenas cinco sequências de amostras provenientes do Paraná; as quais foram caracterizadas como CPV-2c (PINTO et al., 2012). Os subtipos de CPV-2 têm sido reportados em frequências variadas em diversos países do mundo ao longo dos anos, atribuindo-se uma correlação geográfica e temporal dos vírus circulantes (MIRANDA et al., 2016b). No Brasil, o subtipo CPV-2a foi o predominante entre 1980 e 1986, que foi gradual e substancialmente substituído pelo CPV-2b entre 1990 a 1995 (PEREIRA et al., 2000). Castro et al. (2007), entre 1995 e 2004, identificaram apenas o subtipo CPV-2a; de 2004 a 2006 foi reportada a co-circulação dos subtipos CPV-2a e CPV-2b; e entre 2006 e 2009 houve o predomínio do CPV-2b em amostras provenientes do Rio de Janeiro. Estudos mais recentes abrangendo diversas regiões do Brasil, demonstrou que o CPV-2c foi o subtipo predominante entre 2008 e 2011 (PINTO et al., 2012; FONTANA et al., 2013). Nos últimos anos, a emergência de novas variantes do vírus CPV-2 veio acompanhada de mudanças na distribuição dos subtipos (GODDARD e LEISEWITZ, 2010; HOELZER e PARRISH, 2010). Muitos países têm reportado a substituição gradual dos subtipos 2a e 2b pelo subtipo 2c, incluindo países da Europa, América do Norte e América do Sul (CALDERÓN et al., 2011; DECARO et al., 2005; KAPIL et al., 2007; MIRANDA e THOMPSON, 2016b; PINTO et al., 2012). Na América do Sul, os primeiros casos de CPV-2c foram detectados na Argentina (CALDERÓN et al., 2009) e no Uruguai (PÉREZ et al., 2007). No Brasil, o primeiro relato é originário de cães do Rio Grande do Sul (STRECK et al., 2009).

As vacinas atualmente licenciadas no Brasil são constituídas por cepas atenuadas de CPV-2 ou CPV-2b (CASTRO et al., 2011). Diante da alta frequência observada de CPV-2c, é colocado em discussão se as vacinas atuais são capazes de conferir títulos protetores contra subtipos heterólogos (DECARO et al., 2008b; TRUYEN, 2006). Embora alguns autores atestem a eficácia das vacinas atuais contra tipos heterólogos (SPIBEY et al., 2008; WILSON et al., 2014), outros resultados foram conflitantes. Na Europa e nos Estados Unidos, o subtipo 2c foi

detectado em cães sintomáticos e que haviam sido imunizados com vacinas contendo o CPV-2 ou CPV-2b (DECARO et al., 2006; 2008a; HONG et al., 2007).

A maior parte da população canina deste estudo foi de animais não vacinados e com vacinação incompleta. Assim, outra possível explicação para a predominância do CPV-2c (88%) seria a pressão de seleção decorrente desta imunidade inadequada, permitindo o escape do sistema imunológico pelo subtipo heterólogo (CALDERÓN et al., 2009).

Do ponto de vista epidemiológico é essencial efetuar o monitoramento de CPV-2 circulantes, pois há relatos de ocorrência de casos de parvovirose pelo CPV-2c em cães vacinados (DECARO et al., 2008b; 2010; MIRANDA e THOMPSON, 2016a), cães adultos (DECARO et al., 2008b; KAPIL et al., 2007) e até mesmo em felinos (CLEGG et al., 2012; DECARO et al., 2010; MIRANDA et al., 2014). Entretanto, desde a emergência do CPV-2c em 2000 (BUONAVOGLIA et al., 2001), são conflitantes e inconclusivas as avaliações de patogenicidade envolvendo este subtipo viral. A infecção, que nas primeiras descrições foi caracterizada como branda, ultimamente tem sido relacionada com casos de maior gravidade clínica, com alta mortalidade (DECARO et al., 2008b). Neste estudo, a caracterização molecular do CPV-2 eliminado nas fezes de dois cães idosos (9 e 14 anos de idade) identificou o subtipo 2c, e culminou com o óbito de ambos.

Apenas a amostra CPV-2c BR94/PR, apresentou a mutação Thr440Ala em comparação ao CPV-2 original. Esta mutação já foi detectada em CPV-2c circulantes em diversos países do mundo (HOELZER e PARRISH, 2010), mas nunca havia sido reportada no Brasil. Na árvore filogenética, esta amostra formou um subclado distinto juntamente com outras amostras representativas da Argentina e Paraguai (CALDERÓN et al., 2011) e Uruguai (MAYA et al., 2013), que apresentaram a mesma mutação (Figura 4). No resíduo 440 está localizado o principal sítio antigênico da VP-2 e a mutação neste domínio pode afetar a estrutura antigênica e a interação com o receptor transferrina (Trf) nas células alvo (DECARO e BUONAVOGLIA, 2012; MIRANDA e THOMPSON, 2016a; 2016b). O impacto da pressão seletiva da vacina e dos anticorpos colostrais neste resíduo, reforça a necessidade de uma vigilância epidemiológica para investigar a evolução, comportamento e impacto sanitário dos vírus carreando esta mutação (CALDERÓN

et al., 2011; HOELZER e PARRISH, 2010). Ainda nas amostras caracterizadas como CPV-2c, foram identificadas mutações na terceira posição dos resíduos 447 e 500 da proteína VP2, que não resultaram na mudança do aminoácido codificado. Nas amostras BR113/PR, BR117/PR, BR171/PR e BR172/PR, ocorreu a substituição de adenina para timina (Tabela 1). Essa mesma mutação silenciosa somente foi encontrada em uma amostra proveniente da Itália (FJ005212.1), agrupando-se no mesmo subclado dos nossos isolados na árvore filogenética (Figura 4).

As amostras BR43/PR a BR46/PR, BR93/PR, BR95/PR, BR99/PR a BR104/PR, BR109/PR, BR111/PR, BR112/PR, BR123/PR, BR157/PR e BR158/PR apresentaram a mutação sinônima no resíduo 500, de adenina para guanina, igualmente encontrada numa única amostra proveniente da Argentina (KM236578.1). A formação de um subclado distinto evidencia a relação filogenética entre as amostras (Figura 4).

Curiosamente, após o predomínio de infecções determinadas pelo CPV-2c de 2012 a 2015, em 2016, o CPV-2b prevaleceu. Para descartar qualquer possibilidade de excreção de um vírus CPV-2b vacinal, foi feita a avaliação do resíduo 570 da proteína VP2. As cepas CPV-2b vacinais possuem uma mutação no resíduo 570 da VP2 que difere do CPV-2b selvagem (CASTRO et al., 2011). Cepas selvagens codificam o aminoácido lisina (AAA) enquanto as cepas vacinais codificam o aminoácido ácido glutâmico (GAA). No presente estudo, todos os isolados de CPV-2b codificaram o aminoácido lisina no resíduo 570 (dados não mostrados).

O CPV-2a não foi detectado em nenhuma das amostras sequenciadas. No resíduo 555, todas as amostras codificaram o aminoácido valina (Val). Ao longo da evolução do CPV-2, a alteração no resíduo 555 ocorrida do CPV-2 para o CPV-2a, foi caracterizada como Val555Ile (PARRISH et al., 1991). No entanto, em 2001, foi identificada em alguns isolados de CPV-2a a reversão ou retenção nesse resíduo (Ile555Val), indicando uma reversão ao CPV-2 original (MARTELLA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007). Devido a essa recente reversão, não é possível diferenciar os subtipos CPV-2 original do CPV-2a, sendo necessário a avaliação de um fragmento maior da VP2 para caracterização conclusiva. Embora o CPV-2 original não circula desde os anos 90, esta cepa ainda é amplamente utilizada como

antígeno nas vacinas em todo o mundo (CALDERÓN et al., 2009; CASTRO et al., 2011; DECARO et al., 2009).

A análise filogenética do fragmento parcial da VP2 do CPV-2 usado nesse estudo mostrou que há uma importante variação genética dentro desse gene viral e que os clados formados com amostras de outras partes do mundo mostra que as mutações tem ocorrido mesmo em regiões geograficamente distantes o que pode significar a adaptação do vírus a novas condições ou seleção de características positivas que ainda devem ser estudadas.

## 5.5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a parvovirose é uma enfermidade de alta morbidade e mortalidade na população canina da região oeste do Paraná. A predominância do subtipo 2c foi observada até 2015, porém em 2016, a maioria dos casos foram relacionados com o subtipo 2b. Esta distribuição temporal discorda de alguns estudos onde foi observada a gradual substituição dos subtipos 2a e 2b pelo CPV-2c ao longo dos anos (MIRANDA et al., 2016b). Além disso foi detectada uma mutação no resíduo 440, de treonina para alanina, que ainda não havia sido reportada no Brasil. Portanto, o monitoramento constante dos subtipos de CPV-2 circulantes na população canina é de suma importância para subsidiar estudos epidemiológicos, de patogenicidade e de evolução do CPV-2 no Brasil.



## 5.6 REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrheic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, n.7-8, p.521-526, 2006.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of Canine Parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v.82, p.3021 – 3025, 2001.
- CALDERÓN, M.G.; MATTION, N.; BUCAFUSCO, D.; FOGEL, F.; REMORINI, P.; LA TORRE, J. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. **Journal of Virological Methods**. v.159, p.141-145, 2009.
- CALDERÓN, M.G.; ROMANUTTI, C.; D'ANTUONO, A.; KELLER, L.; MATTION, N.; LATORRE, J. Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. **Virus Research**. v.157, p.106-110, 2011.
- CARR-SMITH, S.; MACINTIRE, D.K.; SWANGO, I.J. Canine Parvovirus: Part 1. **Pathogenesis and Vaccination Compendium of Continuous Education on Practice Veterinary**, v.19, p.125-133, 1997.
- CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. **Research in Veterinary Science**. v.90, p.336-340, 2011.
- CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.1093-1098, 2010.
- CASTRO, T.X.; MIRANDA, S.C.; LABARTHE, N.V.; SILVA, L.E.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995-2004. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, p.333-339, 2007.
- CLEGG, S.R.; COYNE, K.P.; DAWSON, S.; SPIBEY, N.; GASKELL, R.M.; RADFORD, A.D. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. **Veterinary Microbiology**, v.157, p. 78-85, 2012.
- DAY, M.J.; HORZINEK, M.C.; SCHULTZ, R.D.; SQUIRES, R.A. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**. v.57, p.E1-E45, 2016.
- DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus – A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. **Veterinary Microbiology**. v.155, p.1-12, 2012.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; DESARIO, C.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M.L.; PARISI, A.; TERIO, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Characterization of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. **Research in Veterinary Medicine**, v.89, p.275-278, 2010.

DECARO, N.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; RICCI, D.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, p.133-138, 2005.

DECARO, N.; DESARIO, C.; LUCENTE, M.S.; AMORISCO, F.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; MARTELLA, M.; BUONAVOGLIA, C. Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvovirus using minor groove binder probes. **Journal of Virological Methods**. v.147, p.67-71, 2008a.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; MARI, V.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. **Vaccine**. v.25, p.1161-1166, 2006.

DECARO N, DESARIO C, ELIA G, MARTELLA, V.; MARI, V.; LAVAZZA, A.; NARDI, M.; BUONAVOGLIA, C. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiologica**, v.31 p.125-130, 2008b.

DECARO, N.; DESARIO, C.; PARISI, A.; MARTELLA, V.; LORUSSO, A.; MICCOLUPO, A.; MARI, V.; COLAIANNI, M.L.; CAVALLI, A.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. **Virology**. v.385, p. 5-10, 2009.

DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**, v.126, p.179-185, 2005.

FONTANA, D.S.; ROCHA, P.R.D.; CRUZ, R.A.S.; LOPES, L.L.; MELO, A.L.T.; SILVEIRA, M.M.; AGUIAR, D.M.; PESCADOR, C.A. A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in Midwestern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p.214-218, 2013.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A.L. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**. v.40, p.1041-1053, 2010.

GREENE, C. E.; DECARO, N. Canine Viral Enteritis in **Infectious Diseases of the Dog and Cat 3<sup>rd</sup> ed**, Elsevier, St Louis, Missouri, p.67-74, 2012.

HOELZER, K.; PARRISH, C.R. The emergence of parvoviruses of carnivores. **Veterinary Research**. v.41, p.39-42, 2010.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TENNER, P.; PARDO, M.C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.19, p.535-539, 2007.

HOUSTON, D.M.; RIBBLE, C.S.; HEAD, L.L. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v.208, p.542-546, 1996.

KAPIL, S.; COOPER, E.; LAMM, C.; MURRAY, B.; REZABEK, G.; JOHNSTON 3<sup>RD</sup>, L.; CAMPBELL, G.; JOHNSON, B. Canine Parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.4044-4047, 2007.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v.33, p.1870-1874, 2016.

MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. **Virus Genes**. v.33, p. 11-13, 2006.

MAYA, L.; CALLEROS, L.; FRANCIA, L.; HÉRNANDEZ, M.; IRAOLA, G.; PANZERA, Y.; SOSA, K.; PÉREZ, R. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. **Archive of Virology**. v.158, p.1133-1141, 2013.

MIRANDA, C.; PARRISH, C.R.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26, p.462-464, 2014.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus in vaccinated dogs: a field study. **Veterinary Record**, v.178, p.397-402, 2016a.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v.97, p.2043-2057, 2016b.

PARRISH, C.R.; AQUADRO, C.F.; STRASSHEIM, M.L.; EVERMANN, J.F.; SGRO, J.; MOHAMMED, H.O. Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus. **Journal of Virology**, v.65, p.6544-6552, 1991.

PEREIRA, C.A.D.; MONEZI, T.A.; MEHNERT, U.; D'ANGELO, M.; DURIGON, E.L. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**. v.75, p.127-133, 2000.

PEREIRA, C.; LEAL, E.; DURIGON, E. Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. **Infection, Genetics and Evolution**. v.7, p.399-409, 2007.

PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, M. First detection on canine parvovirus type 2c in South America. **Veterinary Microbiology**. v.124, p.147-152, 2007.

PINTO, L. D.; STRECK, A. F.; GONÇALVES, K. R.; SOUZA, C. K.; COBERLLINI, A. O.; COBERLLINI, L. G.; CANAL, C. W. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, v.165, p.29-33, 2012.

POLLOCK, R.H.; CARMICHAEL, L.E. Canine Viral Enteritis. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.13, p.551-566, 1983.

SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.102, p. 379-384, 2005.

SPIBEY, N.; GREENWOOD, N.M.; SUTTON, D.; CHALMERS, W.S.K.; TARPEY, L. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology**. v.128, p.48-55, 2008.

STRECK, A.F.; SOUZA, C.K.; GONÇALVES, K.R.; ZANG, L.; PINTO, L.D.; CANAL, C.W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.465-469, 2009.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, v.117, p.9-13, 2006.

WILSON, S.; ILLAMBAS, J.; SIEDEK, E.; STIRLING, C.; THOMAS, A.; PLEVOVÁ, E.; STURE, G.; SALT, J. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. **Vaccine**, v.32, p.5420-5424, 2014.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- O CPV-2 foi detectado em 78% (73/93) das amostras fecais provenientes de cães com gastroenterite da região oeste do Paraná entre 2012 e 2016;
- A caracterização molecular de 41 amostras sequenciadas identificou cinco subtipos CPV-2b e 36 subtipos CPV-2c; o CPV-2 e CPV-2a não foram detectados;
- O CPV-2c foi o subtipo predominante entre 2012 e 2015; sendo substituído pelo CPV-2b em 2016;
- As amostras de CPV-2 agruparam-se em subclados distintos de acordo com as mutações sinônimas e não sinônimas identificadas nos resíduos 440, 447 e 500 da proteína VP2.

## REFERÊNCIAS

- AGBANDJE, M.; MCKENNA, R.; ROSSMAN, M.G.; STRASSHEIM, M.L.; PARRISH, C.R. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. **Proteins**, v.16, p.155-171, 1993.
- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrheic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, n.7-8, p.521-526, 2006.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of Canine Parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v.82, p.3021 – 3025, 2001.
- BERNS, K.I. Parvovirus replication. **Microbiological Reviews**, p. 316-329, 1990.
- CALDERÓN, M.G.; MATTION, N.; BUCAFUSCO, D.; FOGEL, F.; REMORINI, P.; LA TORRE, J. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. **Journal of Virological Methods**. v.159, p.141-145, 2009.
- CALDERÓN, M.G.; ROMANUTTI, C.; D'ANTUONO, A.; KELLER, L.; MATTION, N.; LATORRE, J. Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. **Virus Research**. v.157, p.106-110, 2011.
- CARR-SMITH, S.; MACINTIRE, D.K.; SWANGO, I.J. Canine Parvovirus: Part 1. **Pathogenesis and Vaccination Compendium of Continuous Education on Practice Veterinary**, v.19, p.125-133, 1997.
- CASSEB, A.; CASSEB, L.; VIEIRA, C.; CAMARGO, D.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, L.E. Diagnóstico da Parvovirose Canina pela Técnica de Hemaglutinação. **Revista de Ciências Agrárias**, v.51, p.83-98, 2009.
- CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. **Research in Veterinary Science**. v.90, p.336-340, 2011.
- CASTRO, T.X.; COSTA, E.M.; LEITE, J.P.; LABARTHE, N.V.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.1093-1098, 2010.
- CASTRO, T. X.; MIRANDA, S.C.; LABARTHE, N.V.; SILVA, L.E.; CUBEL GARCIA, R.C.N. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.333-339, 2007.

CAVALLI, A.; BOZZO, G.; DECARO, N.; TINELLI, A.; ALIBERTI, A.; BUONAVOGLIA, C. Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. **New Microbiologica**, v.24, p.239-242, 2001.

CLEGG, S.R.; COYNE, K.P.; DAWSON, S.; SPIBEY, N.; GASKELL, R.M.; RADFORD, A.D. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. **Veterinary Microbiology**, v.157, p. 78-85, 2012.

COTMORE, S.F.; AGDANDJE-MCKENNA, M.; CHIORINI, J.A.; MUKHA, D.V.; PINTEL, D.J.; QIU, J.; SODERLUND-VENERMO, M.; TATTERSTALL, P.; TIJSEN, P. The Family Parvoviridae. **Archive of Virology**, v.159, p.1239-1247, 2014.

DAVIS-WÜRZLER, G.M. 2013 Update on Current Vaccination Strategies in Puppies and Kittens. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.44, p.253-263, 2014.

DAY, M.; HORZINECK, M.; SCHULTZ, D. Guidelines for vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). **Journal of Small Animal Practice**, v.48, p.528-541, 2007.

DAY, M.; HORZINECK, M.; SCHULTZ, D.; SQUIRES, R.A. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, p. E1-E45, 2016.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus – A review of epidemiologic and diagnostic aspects with emphasis on type 2c. **Veterinary Microbiology**, v.155, p.1-12, 2012.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; DESARIO, C.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M.L.; PARISI, A.; TERIO, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Characterization of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. **Research in Veterinary Medicine**, v.89, p.275-278, 2010.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ADDIE, D.D.; MARTELLA, V.; VIEIRA, M.J.; ELIA, G.; ZICOLA, A.; DAVIS, C.; THOMPSON, G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; BUONAVOGLIA, C. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1222-1224, 2007.

DECARO, N.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; RICCI, D.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.133-138, 2005.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; MARI, V.; LAVAZZA, A.; NARDI, M.; BUONAVOGLIA, C. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. **New Microbiologica**, v.31 p.125-130, 2008a.

DECARO, N.; DESARIO, C.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; MARI, V.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. **Vaccine**. v.25, p.1161-1166, 2006.

DECARO, N.; DESARIO, C.; LUCENTE, M.S.; AMORISCO, F.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; MARTELLA, M.; BUONAVOGLIA, C. Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvovirus using minor groove binder probes. **Journal of Virological Methods**. v.147, p.67-71, 2008b.

DECARO, N.; DESARIO, C.; PARISI, A.; MARTELLA, V.; LORUSSO, A.; MICCOLUPO, A.; MARI, V.; COLAIANNI, M.L.; CAVALLI, A.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. **Virology**. v.385, p. 5-10, 2009.

DESARIO, C.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? **Journal of Virological Methods**, v.126, p.179-185, 2005.

FENNER, F.; GIBBS, P.J.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. Classification and nomenclature of viruses in **Fenner's Veterinary Virology 2<sup>nd</sup> ed**, p.22 1993.

FONTANA, D.S.; ROCHA, P.R.D.; CRUZ, R.A.S.; LOPES, L.L.; MELO, A.L.T.; SILVEIRA, M.M.; AGUIAR, D.M.; PESCADOR, C.A. A phylogenetic study of canine parvovirus type 2c in Midwestern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p.214-218, 2013.

GAGNON, C.A.; ALLARD, V.; CLOUTIER, G. Canine parvovirus type 2b is the most prevalent genomic variant strain found in parvovirus antigen positive diarrheic dog feces samples across Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v.57, p.29-31, 2016.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A.L. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.40, p.1041-1053, 2010.

GREENE, C. E.; DECARO, N. Canine Viral Enteritis in **Infectious Diseases of the Dog and Cat 3<sup>rd</sup> ed**, Elsevier, St Louis, Missouri, p.67-74, 2012.

HALL, E.J.; GERMAN, A.J. Diseases of the Small Intestines in **Ettinger&Feldman - Textbook of Veterinary Medicine 9<sup>th</sup> ed**, Elsevier, St Louis, Missouri, p.1526-1572, 2010.

HOELZER, K.; PARRISH, C.R. The emergence of parvovirus of carnivores. **Veterinary Research**, v.41, p.39-42, 2010.

HONG, C.; DECARO, N.; DESARIO, C.; TENNER, P.; PARDO, M.C.; SANCHEZ, S.; BUONAVOGLIA, C. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.19, p.535-539, 2007.



HOUSTON, D.M.; RIBBLE, C.S.; HEAD, L.L. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v.208, p.542-546, 1996.

HUEFFER K, PARRISH R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.392-398, 2003.

KAPIL, S.; COOPER, E.; LAMM, C.; MURRAY, B.; REZABEK, G.; JOHNSTON 3<sup>RD</sup>, L.; CAMPBELL, G.; JOHNSON, B. Canine Parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.4044-4047, 2007.

KANTERE, M. C.; ATHANASIOU, L. V.; SPYROU, V.; KYRIAKIS, C. S.; KONTOS, V.; CHATZOPOULOS, D. C.; TSOKANA, C. N.; BILLINIS, C. Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of Canine Parvovirus under different storage conditions and vaccination status. **Journal of Virological Methods**, v.215-216, p.52-55, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v.33, p.1870-1874, 2016.

MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. **Virus Genes**. v.33, p. 11-13, 2006.

MAYA, L.; CALLEROS, L.; FRANCIA, L.; HÉRNANDEZ, M.; IRAOLA, G.; PANZERA, Y.; SOSA, K.; PÉREZ, R. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. **Archive of Virology**. v.158, p.1133-1141, 2013.

MCCAW, D.; HOSKINS J. Canine Viral Enteritis in: **Greene, C. Infectious Diseases of the Dog and Cat 2nd ed.**, WB Saunders, Philadelphia, USA. Cap 8, p.63-71, 2006.

MIRANDA, C.; PARRISH, C.R.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26, p.462-464, 2014.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine parvovirus in vaccinated dogs: a field study. **Veterinary Record**, v.178, p.397-402, 2016a.

MIRANDA, C.; THOMPSON, G. Canine Parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. **Journal of General Virology**, v.97, p.2043-2057, 2016b.

MORAIS, M.P.; COSTA, P. R. Parvoviridae in **Virologia Veterinária**. UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, p.375-396, 2007.

PARKER, J.S.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. **Journal of Virology**. v.71, p.9214–9222, 1997.

PARRISH, C.R.; AQUADRO, C.F.; STRASSHEIM, M.L.; EVERMANN, J.F.; SGRO, J.; MOHAMMED, H.O. Rapid Antigenic-Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus. **Journal of Virology**, v.65, p.6544-6552, 1991.

PARRISH, C.R.; HAVE, P.; FOREYT, W.J. EVERMANN, J.F.; SENDA, M.; CARMICHAEL, L.E. The Global Spread and Replacement of Canine Parvovirus Strains. **Journal of General Virology**, V.69, p.1111-1116, 1988.

PEREIRA, C.A.D.; MONEZI, T.A.; MEHNERT, U.; D'ANGELO, M.; DURIGON, E.L. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. **Veterinary Microbiology**. v.75, p.127-133, 2000.

PEREIRA, C.; LEAL, E.; DURIGON, E. Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. **Infection, Genetics and Evolution**. v.7, p.399-409, 2007.

PÉREZ, R.; FRANCIA, L.; ROMERO, V.; MAYA, L.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, M. First detection on canine parvovirus type 2c in South America. **Veterinary Microbiology**. v.124, p.147-152, 2007.

PINTO, L. D.; STRECK, A. F.; GONÇALVES, K. R.; SOUZA, C. K.; COBERLLINI, A. O.; COBERLLINI, L. G.; CANAL, C. W. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. **Virus Research**, v.165, p.29-33, 2012.

POLLOCK, R.H.; CARMICHAEL, L.E. Canine Viral Enteritis. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.13, p.551-566, 1983.

POLLOCK, R.H.; COYNE, M.J. Canine Parvovirus. **Veterinary Clinics of North America – Small Animals**, v.23, p.555-568, 1993.

PRATELLI, C.R.; CAVALLI, A.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Canine Parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p. 612-615, 2001.

PRITTIE, J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.14, p.167-176, 2004.

PROKSCH, A.L.; UNTERER, S.; SPECK, S.; TRUYEN, U.; HARTMANN, K. Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. **The Veterinary Journal**, v.204, p.304-308, 2015.

SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.102, p. 379-384, 2005.

SPIBEY, N.; GREENWOOD, N.M.; SUTTON, D.; CHALMERS, W.S.K.; TARPEY, L. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. **Veterinary Microbiology**. v.128, p.48-55, 2008.

STRECK, A.F.; SOUZA, C.K.; GONÇALVES, K.R.; ZANG, L.; PINTO, L.D.; CANAL, C.W. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.465-469, 2009.

TOUIHRI, L.; BOUZID, I.; DAOUD, R.; DESARIO, C.; GOULLI, A.F.; DECARO, ABDERRAZAK, G.; BUONAVOGLIA, C.; BAHLOUL, C. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. **Virus Genes**. V.38, p.249-258, 2009.

TRUYEN, U. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? **Veterinary Microbiology**, v.117, p.9-13, 2006.

TRUYEN, U.; EVERMANN, J.F.; VIELER, E.; PARRISH, C.R. Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range. **Virology**, v. 215, p. 186-189, 1996.

TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LUO, M.; SMITH, T.J.; ROSSMAN M.G.; COMPANS, R.W.; et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, v. 251, p. 1456-1464, 1991.

WILSON, S.; ILLAMBAS, J.; SIEDEK, E.; STIRLING, C.; THOMAS, A.; PLEVOVÁ, E.; STURE, G.; SALT, J. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. **Vaccine**, v.32, p.5420-5424, 2014.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A:** Características dos cães diagnosticados positivos para CPV-2 e análise molecular do fragmento do gene VP2 das amostras sequenciadas. Apenas os resíduos de nucleotídeos (nt 1270 a 1696) e/ou aminoácidos (aa 426 a 565) que exibiram diferenças foram especificados.

Amostra	Ano	Idade (meses)	Sexo	Raça	Histórico vacinal	CPV-2 (Subtipo)	Desfecho clínico	aa 426			aa 440			aa 447			aa 500		
								nt 1276	nt 1277	nt 1278	nt 1318	nt 1319	nt 1320	nt 1339	nt 1340	nt 1341	nt 1498	nt 1499	nt 1500
M38245.1						2		A	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A
M24000.1						2a		A	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A
M74849.1						2b		G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A
FJ222821.1						2c		G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR43/PR	2012	5	F	Labrador	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR44/PR	2012	2	F	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR45/PR	2012	2	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR46/PR	2012	2	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR47/PR	2012	2	M	SRD	NV		Óbito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR93/PR	2013	24	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR94/PR	2013	2	M	SRD	VC	2c	Vivo	G	A	A	G	C	A	A	T	A	G	T	A
BR95/PR	2013	8	F	Fila	VI	2c	NI	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR99/PR	2013	4	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR100/PR	2013	1,5	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR101/PR	2013	3	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR102/PR	2013	3	M	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR103/PR	2013	5	F	Boxer	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR104/PR	2013	12	M	Schnauzer	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR105/PR	2013	5	M	Husky	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR106/PR	2013	7	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR109/PR	2013	4	M	Pinscher	VI	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR110/PR	2013	3	F	Pug	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A

[illegible]

Identificação da amostra	Ano	Idade (meses)	Sexo	Raça	Histórico vacinal	CPV-2 (subtipo)	Desfecho clínico	aa 426			aa 440			aa 447			aa 500		
								nt 1276	nt 1277	nt 1278	nt 1318	nt 1319	nt 1320	nt 1339	nt 1340	nt 1341	nt 1498	nt 1499	nt 1500
BR141/PR	2015	12	F	Lhasa	VI	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR142/PR	2015	3	F	Lhasa	VC	nd	Óbito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR144/PR	2015	6	F	Boxer	VC	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR145/PR	2015	5	F	Chow C	VI	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR146/PR	2015	2	F	SRD	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR149/PR	2015	3	F	Pastor	VC	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR150/PR	2015	2	M	SRD	NV	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR154/PR	2015	5	F	Pinscher	NV	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR157/PR	2015	24	F	Fila	VI	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR158/PR	2015	36	F	SRD	VI	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	G
BR160/PR	2015	7	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR162/PR	2015	120	M	Lhasa	NA	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR163/PR	2015	1,5	M	Bulldogue	NV	nd	Óbito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR164/PR	2015	6	F	Dogue	VI	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR165/PR	2015	4	M	SRD	NV	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR166/PR	2015	7	M	SRD	NA	nd	Óbito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR167/PR	2015	2	M	SRD	NV	nd	Óbito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR168/PR	2015	2	F	SRD	NV	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR169/PR	2015	3	M	SRD	NV	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR170/PR	2015	36	F	SRD	NA	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR171/PR	2015	9	F	Lhasa	NV	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	T	G	T	A
BR172/PR	2015	5	F	Pitbull	NA	2c	Óbito	G	A	A	A	C	A	A	T	T	G	T	A
BR178/PR	2015	7	M	NI	NA	2b	NI	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A

Identificação da amostra	Ano	Idade (meses)	Sexo	Raça	Histórico vacinal	CPV-2 (subtipo)	Desfecho clínico	aa 426			aa 440			aa 447			aa 500		
								nt 1276	nt 1277	nt 1278	nt 1318	nt 1319	nt 1320	nt 1339	nt 1340	nt 1341	nt 1498	nt 1499	nt 1500
BR180/PR	2016	2	F	Labrador	NV	2b	Óbito	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR181/PR	2016	12	M	Red Hiller	VI	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR185/PR	2016	3	F	SRD	NV	nd	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR186/PR	2016	2	M	SRD	NV	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR187/PR	2016	NA	F	SRD	NA	2c	Vivo	G	A	A	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR193/PR	2016	4	F	Boxer	VI	2b	Vivo	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR194/PR	2016	24	M	SRD	NV	nd	Vivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR195/PR	2016	5	F	SRD	NA	2b	Vivo	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A
BR196/PR	2016	6	M	SRD	NA	2b	Óbito	G	A	T	A	C	A	A	T	A	G	T	A

\*: Códigos de acesso no *Genbank* de amostras de referência de CPV-2.

F: fêmea; M: macho; NA: não avaliado; NV: não vacinado; VI: vacinação incompleta; VC: vacinação completa de acordo com a idade; SRD: sem raça definida; NI: não informado;

Resíduo aa 426: AAT-Asn; GAT-Asp; GAA-Glu. Resíduo aa 440: ACA-Thr; GCA-Ala. Resíduo aa 447: ATA-Ile; ATT-Ile. Resíduo aa 500: GTA-Val; GTG-Val. Resíduo aa 555: GTA-Val; ATA-Ile.

Os campos indicados com traços (-) representam as amostras positivas não sequenciadas.